

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-501506

(43) 公表日 平成11年(1999) 2月9日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/00		C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 38/00	A D S	A 6 1 K 39/395	M
38/21	A D U	C 0 7 K 14/52	
39/395		14/525	
C 0 7 K 14/52		14/535	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-519191	(71) 出願人	ベス イスラエル デアコネス メディカル センター
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)12月12日		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997)6月11日		ストン ワン デアコネス ロード (番地
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 5 / 1 6 0 4 6		なし)
(87) 国際公開番号	W O 9 6 / 1 8 4 1 2	(72) 発明者	ストローム テリー ピー.
(87) 国際公開日	平成8年(1996)6月20日		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 プ
(31) 優先権主張番号	0 8 / 3 5 5 , 5 0 2		ルックリン ケナード ロード 22
(32) 優先日	1994年12月12日	(72) 発明者	ツェン シン-シャオ
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 プ
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 3 1 , 5 3 5		ルックリン ビーコン ストリート 1870
(32) 優先日	1995年4月28日		アパートメント 4-5
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	弁理士 清水 初志
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラ型サイトカインおよびその利用

(57) 【要約】

酵素的に不活性であり、かつサイトカインの循環血中半減期を増加させるポリペプチドを融合させたサイトカインを有するキメラタンパク質を開示する。このキメラタンパク質は、患者における敗血性ショック、肉芽腫性疾患、I型糖尿病、および種々の癌（例えば多発性骨髄腫）を含む種々の疾患の治療、抑制、または予防に有用である。

【特許請求の範囲】

1. ヒトの体内で酵素的に不活性であり、かつインビボにおけるサイトカインの循環血中半減期を少なくとも2倍に増加させるポリペプチドに結合した該サイトカインを含む、キメラタンパク質。
2. 酵素的に不活性なポリペプチドがインビボにおけるサイトカインの循環血中半減期を少なくとも10倍に増加させる、請求項1記載のキメラタンパク質。
3. 酵素的に不活性なポリペプチドがIgGのヒンジ領域を含む、請求項1記載のキメラタンパク質。
4. 酵素的に不活性なポリペプチドがアルブミンを含む、請求項1記載のキメラタンパク質。
5. 酵素的に不活性なポリペプチドがIgG分子のFc領域を含み、かつIgG重鎖の可変領域を欠く、請求項1記載のキメラタンパク質。
6. 酵素的に不活性なポリペプチドがさらにIgGのヒンジ領域を含む、請求項5記載のキメラタンパク質。
7. Fc領域が溶解性である、請求項5記載のキメラタンパク質。
8. Fc領域が補体結合およびタンパク質によるFc受容体との高親和性結合を抑制する変異を含む、請求項5記載のキメラタンパク質。
9. サイトカインが、インターロイキン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン α 、インターフェロン β 、およびインターフェロン γ を含む群から選択される、請求項1記載のキメラタンパク質。
10. サイトカインが腫瘍壊死因子である、請求項1記載のキメラタンパク質。
11. インターロイキンがIL-10である、請求項9記載のキメラタンパク質。
12. インターロイキンがIL-6である、請求項9記載のキメラタンパク質。
13. インターロイキンがIL-4である、請求項9記載のキメラタンパク質。
14. インターロイキンがIL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、およびIL-15を含む群から選択される、請求項9記載のキメラタンパク質。
15. 薬学的に許容される担体を混合した請求項1記載のキメラタンパク質を含む、治療用組成物。

16. 患者の肉芽腫形成を抑制するための医療用製剤における IL-10/Fcの利用。

【発明の詳細な説明】キメラ型サイトカインおよびその利用発明の背景

本発明は、一つのサイトカインおよび酵素的に不活性な一つのポリペプチドを含むキメラタンパク質に関し、その治療的な利用にも関する。

サイトカインは細胞の増殖および分化に関する広範な作用を持つ。いくつかのサイトカインの意義は明らかになっている。例えば、IL-2は、活性化T細胞、B細胞、LAK細胞、およびNK細胞の増殖を促す。IL-3は、多能性の造血前駆細胞の増殖を促す。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、好中球およびマクロファージの増殖および分化を促し、マクロファージを活性化する。kitリガンドは、好塩基球および肥満細胞の分化を促進する。IL-4は、B細胞の増殖を促し、クラスII遺伝子の発現を増強させ、IgG1およびIgEの産生を増加させ、活性化T細胞の増殖およびエフェクター細胞の機能を促進する。IL-5は、IgAの産生を増加させ、好酸球の増殖を促す。IL-6は、骨髄腫の増殖を一過性に阻害し、免疫グロブリンの産生を促し、形質細胞および肝細胞の増殖を誘導する。IL-7は、非成熟期および成熟期のB細胞およびT細胞の増殖を誘導する。インターフェロン α および β は、パピローマウイルス、肝炎ウイルス、およびヘルペスウイルスに対する抗ウイルス作用を有し、毛状細胞白血病、骨髄腫、およびその他の造血器系癌を治癒させる。サイトカインのその他の機能の一部は以下に要約した。

報告されているIL-1の作用には、T細胞の活性化、IL-2受容体の発現およびサイトカイン遺伝子の発現の誘導、線維芽細胞によるコラゲナーゼ、ストロメライシン、プロスタグランジン、およびPDGF-AAの合成の増強、胸腺細胞の増殖の同時刺激、B細胞前駆体の分化の惹起、B細胞の増殖およびIgの分泌の同時刺激、IL-2およびIFNによって誘導されるNK媒介性細胞障害性の活性化の増強、内皮細胞による接着分子の発現の誘導、骨芽細胞および内皮細胞の活性化、上皮細胞によるコラーゲン産生の増強、組織損傷後の修復機能の調節、インスリン分泌の誘導、膵島 β 細胞に対する細胞傷害性などが含まれる。

また、IL-1は、インビトロにおいて、骨髄細胞およびリンパ系細胞株からの、細胞の増殖および分化に関連する因子の放出を促すことも示されている。IL-1は

、ヒト骨髓間質細胞による顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)およびマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の産生の誘導、ヒト皮膚線維芽細胞によるGM-CSFおよびG-CSFの産生の誘導、ならびにヒト末梢血リンパ細胞によるGM-CSFの産生の誘導などの作用も有すると考えられている。また、IL-1は、種々のコロニー刺激因子に対する受容体のアップレギュレーション、および骨髓内の多能性の前駆細胞の増殖を誘導することによって造血を促す。IL-1を投与されたマウスは、それ以外のマウスには致死的な量の放射線照射から防御されることが報告されており、このことはIL-1が癌治療において有用であることを示す。また、IL-1はおそらく血管新生および線維芽細胞の活性化を誘導する能力を有するために、創傷治癒を促進させることも示されている。

IL-2には、T細胞、NK細胞、およびLAK細胞の活性化、殺腫瘍活性、および増殖、B細胞の増殖およびイムノグロブリン産生の増強、IFN- γ 産生の増強、ヒト単球によるIL-6産生の誘導、刺激を受けた好塩基球によるヒスタミン放出の調節、IL-2受容体の発現の調節などに関与していることが報告されている。IL-2の適用法には、IL-2により活性化されたLAK細胞およびTIL細胞を融合させる方法による抗腫瘍療法、免疫不全疾患を治療するためのIL-2レベルの増強、ならびに骨髓移植後のNK細胞活性の増加などが含まれる。

報告されているIL-3の機能には、肥満細胞株の増殖の惹起、単離造血前駆細胞からの好中球、マクロファージ、巨核球、好塩基球、好酸球、および肥満細胞の形成の惹起、特定のヒトTリンパ球の増殖の促進、好酸球、好塩基球、および好中球の活動の増強などが含まれる。IL-3は、多能性の前駆細胞の初期発生における複数株コロニー形成を補助する能力を有することも示されている。IL-3は幹細胞因子(kitリガンド)との相乗作用により、ヒトCD34⁺細胞の好塩基球および肥満細胞への分化を誘導する。IL-3はGM-CSFなどの因子との併用により、霊長類における造血を促すために用いられている。さらに、IL-3とIL-6を連続投与することにより、霊長類においては血小板新生が引き起こされる。インビトロの研究では、IL-3をAZT療法に伴う造血器系毒性の抑制に用いることができると考えられている。また、組換えIL-3は、その他のコロニー刺激因子との併用により、再生不良性貧血の治療法として臨床試験に用いられている。

IL-4は、休止期のB細胞におけるMHCクラスII発現のアップレギュレーション、B細胞によるIgG1、IgE、およびsIgMの産生の増強、B細胞および単球の細胞膜上におけるIgEに対するFc受容体の発現のアップレギュレーション、休止期の正常T細胞および特定のT細胞株の生存能力および増殖の増強、特定の肥満細胞株の増殖の同時刺激、Lyt-2-/L3T4-胸腺幹細胞の維持、胸腺細胞の成熟の促進、それぞれG-CSF、EPO、およびIL-1による顆粒球-マクロファージ前駆細胞、赤血球前駆細胞、および巨核球の増殖の増強、培養系におけるヒト乳癌細胞の増殖の抑制、B細胞の発達の誘導、培養マクロファージにおける殺腫瘍活性の誘導、内皮細胞の細胞膜上における接着分子の発現の調節などに有用であることが報告されている。

さらに、IL-4はIL-1の共存下において、抗原特異的T細胞に対する自己分泌増殖因子として作用して、マクロファージにおける抗原提示および食作用を増強させると考えられている。IL-4は、休止期のマウス細胞からの細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の発生を増強するだけでなく、LAK活性も誘導する。特定のT細胞およびB細胞の反応を増強することが報告されている多機能性のサイトカインとして、IL-4の治療的な機能には、骨髄移植後の細胞性および体液性免疫機能の再構築、急性リンパ芽球腫性白血病の最終分化の誘導、IgM過剰血症に伴う免疫不全の寛解、固形腫瘍およびB細胞リンパ腫の成長の抑制、IL-1、TNF、およびIL-6の産生のダウンレギュレーションを介する炎症過程の抑制、などが含まれる。また、IL-4は、例えば自己免疫性糖尿病ならびに実験的およびT細胞依存性のアレルギー性脳脊髄炎などの、T細胞依存性の自己免疫疾患の前臨床的モデルの治療にも用いられている（Rapoportら、1993, J. Exp. Med. 178:87-99; Rackeら、1994, J. Exp. Med. 180:1961）。このため、IL-4は、T細胞依存性の免疫活動が関与している種々の病態の治療に使用してもよい。

IL-5は、ヒト骨髄液体培養系において好酸球コロニーを誘導して、末梢血好酸球による、抗体を介する腫瘍細胞死を誘導することが示されている。また、IL-5は、マウスB細胞の分化および増殖を促し、B細胞におけるIgAおよびIgMの分泌を促すことも示されている。IL-5は好酸球の活動性の変化が関連する病態を治療するために有用である。例えば、IL-5の用途として考えられているものに、住血吸

虫症の治療がある（例えば、Sanderson, April, 1989, " International Conference

on the Clinical Impact of Interleukins" at the Royal College of Physicians in Londonを参照）。その他の報告は、IL-5を特定の腫瘍を有する患者の治療に使用することができることを示唆している（例えば、Kolbら、1979, Br.J. Cancer 40:410; Pretlowら、1983, Cancer Res.43:2997; Iwasakiら、1986, Cancer 58:1321を参照）。

IL-6は、EBV形質転換B細胞、T細胞、メサングウム細胞、およびケラチノサイトを含む数多くの細胞の増殖の誘導、多能性の造血前駆細胞のIL-3依存的な増殖の亢進、巨核球の成熟の促進、神経分化の誘発、特定の悪性黒色腫細胞株、骨髄性白血病細胞株、および乳癌細胞株の増殖の抑制、B細胞の分化の誘導、IgGの分泌の惹起、細胞障害性T細胞の分化の誘導、などを含む多様な機能を示すことが報告されている。

このほか、IL-6は、IL-2の存在下においてマウス胸腺細胞のLyt-2⁺ CTL細胞への分化を誘導する作用があり、また、インビトロにおいてCon AまたはT細胞受容体抗体によって引き起こされるT細胞の増殖を補助する。また、IL-6は、胸腺細胞の増殖を同時刺激し、肝細胞からの急性期反応質の放出を誘導することも報告されている。また、IL-6は、多発性骨髄腫の患者から採取した腫瘍細胞に対しては自己分泌増殖因子でも考えられている。

IL-7は、T細胞増殖因子の活性を持つことが報告されている。幹細胞因子は、IL-7との相乗作用により、初期T細胞前駆細胞の増殖を促す。また、IL-7はCon Aの同時刺激因子として、精製マウスT細胞の増殖も誘導する。また、IL-7は分裂促進濃度以下のCon AおよびPHAの存在下において、ヒト末梢血Tリンパ球の増殖を促すことも報告されている。一部の研究では、IL-7がヒトCD8⁺ T細胞に直接的に作用して細胞障害性を増強させること、およびIL-7がCTLの発生をもたらす強力な分化誘導因子であることが示唆されている。

マウスでは、IL-7がCD8⁺ T細胞に作用して、IL-2およびIL-6に依存的な様式でCTLを誘導することが示されている。IL-7はIL-1によって誘導されるマウス胸腺細胞

胞の増殖に必要である。さらに、IL-7はマウスの末梢リンパ組織から調製したCD⁸⁺細胞のLAK活性を誘導することが示されている。IL-7は、メラノサイトおよび悪性黒色腫細胞の細胞表面におけるICAM-1分子の発現を増加させることが示されて

いる。マウスへのIL-7の注入投与により、循環血中の未成熟B細胞の数は3倍から5倍に増加し、同時に骨髄内の骨髄前駆細胞の数は90%減少し、脾臓内の骨髄前駆細胞の数は15倍に増加する。このため、IL-7は、インビボにおいて、IL-2に関して報告されているものと同様な範囲の治療的活性を有すると考えられている。

IL-9は、マウス赤血球前駆細胞の増殖を促し、エリスロポエチンおよびIL-3の存在下において赤血球の分化を促進する (Bourettら、1992, *Exp.Hematol.* 20:868)。IL-9は、インビトロにおけるT細胞細胞株の生存能力を高めることも報告されている (Renaudら、1990, *Cytokine* 2:9)。また、IL-9は、ヒトBリンパ球によるIL-4依存性のIg産生を増強し、骨髄由来のマウス肥満細胞株によるIL-6の産生も促進する。さらに、IL-9は海馬前駆細胞の分化にも関与している (Uyttenhoveら、1991, *J.Exp.Med.* 173:519)。

IL-10は、活性化Th2細胞、B細胞、ケラチノサイト、単球、およびマクロファージによって産生されるサイトカインである (Mooreら、1993, *Annu.Rev.Immunol.* 11:165)。IL-10は、活性化ヒトB細胞の増殖および分化を促すために使用することができる。インビトロにおいて、マウスおよびヒトのIL-10は、Th1細胞、NK細胞、単球、およびマクロファージによるサイトカイン (例えばIFN- γ 、TNF- β 、およびIL-2) の合成を抑制する (Fiorentinoら、1989, *J.Exp.Med.*, 170:2081-2095; Fiorentinoら、1991, *J.Immunol.* 146:3444; Hsuら、1992, *Int.Immunol.* 4:563; Hsuら、1992, *Int.Immunol.* 4:563; D'Andreaら、1993, *J.Exp.Med.* 178:1041; de Waal Malefytら、1991, *J.Exp.Med.* 174:915; Fiorentinoら、1991, *I.Immunol.* 147:3815)。このため、IL-10は、Th1細胞の反応を阻害することによって、移植時の拒絶反応、ならびにI型糖尿病および多発性硬化症などのT細胞を介する自己免疫疾患を予防するために有用である。IL-10に炎症誘発性サイトカイン (例えばIL-1、IL-6、IL-8、およびTNF- α) の分泌を抑制する能力があることは、IL-10が

、慢性関節リウマチおよび乾癬の治療に用いることができる有用な抗炎症薬であると考えられる。

IL-10の敗血症の治療における意義はよく知られている。入院患者におけるグラム陰性菌性の敗血症は、罹患率も死亡率も一貫して高い (Bone, 1991, Ann.Intern.Med. 115:457)。致死率が20~60%であるとの事実は、有効な治療法がないこ

とに加え、急性肺損傷 (Byrneら、1987,Acute Care 13:206) および多臓器不全 (Abramsら、1989, Surg.Rounds 12:44) が高い頻度で発症することを反映している。グラム陰性細菌の産物である内毒素 (LPS) は、敗血性ショックの病態を引き起こす主要な原因物質である (Glausnerら、1991, Lancet 338:732)。実験動物にLPSを単回注射することにより、敗血性ショック様症候群を実験的に誘発させることができる。IL-10をマウスに注射することにより、インビボにおける腫瘍壊死因子の分泌が抑制され、マウスは内毒素の致死的作用から防御される (Gerardら、1993,J.Exp.Med.177 (2) :547; de Waal Malefytら、1991,J.Exp.Med.174:915;Fiorentinoら、1991,J.Immunol.147:3815; Mooreら、1990,Science 248:1230)。

扁形動物の一属である住血吸虫は、感染すると直ちに虫体が肝内に産卵し、これが肉芽腫形成および肝組織の線維化の原因となる。住血吸虫感染によって引き起こされる肝障害は、肝硬変に到ることもある。住血吸虫症は慢性および衰弱性であることが多い。

天然のサイトカインの循環血中半減期は短い。例えば、天然のIL-10が治療的に有効であるのは、投与後の約30分間である (Gerardら、1993, J.Exp.Med. 177 (2) :547)。

発明の概要

本発明者は、サイトカインの寿命を延長するが、それ自体はヒト体内では酵素的に不活性な一つのポリペプチドと、一つのサイトカインとを結合させることにより、そのサイトカインの生体内半減期を延長させることができることを発見し、このキメラ型サイトカイン (すなわち、キメラタンパク質またはキメラ体) の

一部が、敗血性ショック、肉芽腫性疾患（例えば住血吸虫症）、I型糖尿病、特定の癌（例えば多発性骨髄腫）、および慢性感染症などの疾患の治療または発症抑制に有用であることを発見した。

したがって、一つの面において、本発明は、ヒト体内で酵素的に不活性であり、インビボにおけるサイトカインの循環血中半減期を少なくとも2倍に延長し、好ましくは10倍に延長する一つのポリペプチドと、一つのサイトカインとを結合させたキメラタンパク質を特徴とする。

使用できる酵素的に不活性なポリペプチドには、酵素でないアルブミンなどの

タンパク質だけでなく、ヒト以外の生物の体内では酵素的に活性があるが、ヒト体内では不活性の酵素も含まれる。例えば、使用できるポリペプチドには、植物、ブタまたは齧歯類のグリコシルトランスフェラーゼ、および α -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼが含まれる（Sandrinら、1993, PNAS 90:11391）。

酵素的に不活性なポリペプチドには、IgGヒンジ領域および半減期延長性のポリペプチドを含めることもできる。この態様において、IgGヒンジ領域はサイトカインと結合し、サイトカインと半減期延長性のポリペプチド（例えば、IgG Fcまたはアルブミン）との間の可動性のポリペプチド・スペーサーとして働く。

酵素的に不活性なポリペプチドにIgGのヒンジ領域およびIgG分子のFc領域を含める場合は、可変領域によって定まる結合特異性をキメラ体が見せないように、それはIgGの重鎖の可変領域を欠如しているものとする。Fc領域には、補体結合反応を抑制し、FcがFc受容体と高い親和性で結合することを防ぎ、それによってキメラ体が溶解性となることを予防するために変異を含めることができる。また、Fc領域は溶解性であってもよい。すなわち、Fc領域が補体と結合して、キメラ体が結合した細胞を可溶化させる能力を持つこともできる。

キメラタンパク質のサイトカイン部分には、IL-10、IL-6、IL-4、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、またはIL-15などのインターロイキンを用いることができる。使用できるその他のサイトカインには、GM-CSF、G-CSF、インターフェロン（例えばTNF- α 、TNF- β 、およびTNF- γ ）、および腫瘍壊死因子（例えばTNF- α 、およびTNF- β ）が含まれる。

本発明のキメラ型サイトカインは、キメラタンパク質と薬学的に許容される担体とを混合することによって作成される治療用組成物に用いることができる。種々の態様において、本発明は、種々の病態の治療または発症抑制のための方法を提供する。例えば、IL-10キメラ体およびIL-4キメラ体はいずれも、肉芽腫形成（例えば住血吸虫症）の治療または抑制のために使用することができる。また、IL-10キメラ体およびIL-4キメラ体は、I型糖尿病の発症抑制、クローン病、潰瘍性大腸炎、もしくはベック病の治療または発症抑制に有用である。IL-10キメラ体は、敗血性ショックの治療または抑制に有用である。IL-6キメラ体は、多発性骨髄腫患者の治療または発症抑制に有用である。TNF- α キメラ体およびTNF- β キメラ

体はいずれも、パピローマウイルスに起因する子宮頸部癌、肝炎ウイルスに起因する肝ガン、およびヘルペスウイルスに起因する皮膚発疹の治療に有用である。

「サイトカイン」とは、免疫応答の発生時のように、一つの細胞集団（例えば、初回刺激を受けたTリンパ球）が、細胞間伝達因子として作用する特異的抗原と接触することによって放出する抗体以外のすべてのタンパク質を意味する。サイトカインの中でも重要なクラスの一つが、T細胞などのリンパ球の増殖を促すサイトカイン類である。

IgGの「Fc」領域とは、IgGをパパインで消化することにより産生されるIgGのC端領域と相同な天然のポリペプチドまたは合成ポリペプチドを意味する。IgGのFc領域の分子量は約50 kDである。本発明の分子においては、Fcの全領域を用いることも、半減期延長性の部分のみを用いることもできる。さらに、天然物の活性がすべての場合において必要であるとも望ましいとも限らないため、アミノ酸配列に多くの改変を加えることも許容される。

「非溶解性」のIgG Fcとは、親和性の高いFc受容体結合部位を持たず、C'1q結合部位も存在しないIgG Fc領域を意味する。親和性の高いFc受容体結合部位では、IgG Fcの第235位アミノ酸がロイシン残基である。Leu 235を変異または欠失させることにより、このFc受容体結合部位を機能的に破壊することができる。例えば、Leu 235をグルタミンに置換することにより、Fc受容体と高い親和性で結合

するFc領域の能力は抑制される。C'1q結合部位は、IgG1のGlu 318、Lys 320、およびLys 322の各残基を変異または欠失させることによって機能的に破壊することができる。例えば、Glu 318、Lys 320、およびLys 322をアラニン残基で置換することにより、IgG1 FcはADCCを引き起こす能力を失う。

「溶解性」のIgG Fcとは、親和性の高いFc受容体結合部位、およびC'1q結合部位を有するIgG Fc領域を意味する。親和性の高いFc受容体結合部位は、IgG Fcの第235位にロイシン残基を含む。C'1q結合部位は、IgG1にGlu 318、Lys 320、およびLys 322を含む。溶解性のIgG Fcには、野生型の残基を有するもの、またはこれらの結合部位に保存的なアミノ酸の置換が行われたものが含まれる。溶解性のIgG Fcは、抗体依存性細胞障害（ADCC）または補体依存性細胞障害（CDC）の細胞を標的にできる。

IgGの「ヒンジ」領域とは、イムノグロブリン型分子の2つの重鎖を連結するジスルフィド結合部位にシステイン残基が含まれる、天然のIgGの部分と相同なポリペプチドを意味する。IgG1についても、ヒンジ領域には、 $\gamma 1$ と軽鎖とを連結するジスルフィド結合部位にシステイン残基が含まれる。ヒンジ領域の長さは、IgG1、IgG2、およびIgG4においては約13~18アミノ酸残基であり、IgG3においては約65アミノ酸残基である。

ポリペプチドの「スペーサー」とは、半減期延長性のポリペプチドとサイトカインとの間に位置し、正規化B値（ B_{norm} ；柔軟性の指標）が1.000以上、好ましくは1.125以上、また最適には1.135以上であるアミノ酸を含むポリペプチドを意味する（例えば、Karpusら、1985、Naturwissenschaften 72:212を参照）。可動性であることが一般に知られているアミノ酸には、グルタミン酸、グルタミン、スレオニン、リジン、セリン、グリシン、プロリン、アスパラギン酸、アスパラギン、およびアルギニンが含まれる。

本発明はいくつかの特徴および利点を有する。（1）本発明のキメラタンパク質は、循環血中半減期が延長されており、長期間の防御能を有する。（2）本発明において有用なサイトカイン類および半減期延長性のポリペプチドの多くはすでに精製されているため、このキメラタンパク質は、サイトカインおよび半減期

延長性のポリペプチドの精製法としてすでに記載されている方法を用いることにより、容易に精製することができる。(3) キメラタンパク質の一部は、抗体依存性細胞障害 (ADCC) および補体性細胞溶解 (CDC) に関与しないように変異を加えられており、このため、これらは標的細胞を破壊することなく、敗血性ショック、I型糖尿病、または多発性骨髄腫の治療または発症抑制に使用することができる。

Fcポリペプチドを含むキメラタンパク質のもう一つの利点は、これらが血液脳関門を通過することができず、脳内に到達することができないことである。IL-6、腫瘍壊死因子、IL-1 α 、およびIL-1 β などのポリペプチドは、脳内の各種調節中枢に作用することにより、種々の副作用を引き起こす可能性がある。Fcポリペプチドの非存在下でこれらのサイトカイン類によって引き起こされる副作用には、傾眠、発熱、および低血圧が含まれる。

本発明のその他の特徴および利点は、本発明の好ましい態様に関する以下の説明、および請求の範囲から明らかとなるであろう。

詳細な説明

まず、図面に関して簡単に説明する。

図面

図1は、マウス IL-10/Fcキメラ型サイトカインを作製することを目的として、マウス IL-10およびマウス Fc γ 2a cDNAを遺伝的に融合するために用いた模式図である。Fc γ 2a断片のCH2ドメインには、部位特異的突然変異誘発法により、Glu 318、Lys 320、およびLys 322をアラニン残基に置換する変異を作成した。また、マウス IL-10/Fcキメラタンパク質がADCCおよびCDCを引き起こす能力を無効化するため、Leu 235はグルタミン酸に置換した。本明細書ではこれ以後、この非溶解性のキメラタンパク質を「IL-10/Fc」と表記する。この溶解性のキメラタンパク質（変異を加えていないもの）は、「IL-10/Fc++」と表記する。

図2A-Bは、IL-10/Fcキメラタンパク質のウエスタンブロット分析によって得られたプロットを複写したものである。SDS-ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動は還元条件（レーン2～4）および非還元条件（レーン5～7）下で行った。ウエス

タンブロット法は、mIgG Fcに対する抗体（図2A）またはmIL-10に対する抗体（図2B）を用いて実施した。図2Aおよび図2Bのいずれにおいても、レーン1では高分子量の標準タンパク質を泳動した。レーン2および5ではmIgG2aを泳動した。レーン3および6ではIL-10/Fc++を泳動した。レーン4および7ではIL-10/Fcを泳動した。

図3は、rIL-10（野生型、組換えIL-10）およびIL-10/Fcが、LPSによって誘導される、マクロファージによるIL-6の産生を抑制することを示したヒストグラムである。PU5-1.8細胞（ 10^6 個/ml）を、図に示した種々の濃度のIL-10/FcまたはrIL-10とともに、24時間予めインキュベートした。それからLPS（ $10 \mu\text{g/ml}$ ）を添加し、細胞をさらに24時間インキュベートした。上清を採取し、ELISA法によってIL-6の濃度を測定した。

図4は、肥満細胞の増殖に対するIL-10/Fcの同時刺激効果を示したヒストグラムである。rIL-10またはIL-10/Fcが、IL-4依存性のMC/9肥満細胞の増殖を増強させる能力を、 $[\text{H}]$ チミジン取り込みアッセイ法によって評価した。MC/9肥満細胞（ 5×10^3 細胞/ml）は、rIL-10（ 100 U/ml ）、IL-10/Fc（ 100 U/ml ）、rIL-4（ 100

U/ml ）、またはこれらの因子の併用のそれぞれの条件で、図示の通り、中和性の抗マウスIL-10 mAbの存在下または非存在下において3日間培養した。

図5は、IL-10/Fcの循環血中半減期をプロットしたものである。キメラタンパク質（ $8 \mu\text{g}$ ）を単回静脈内注射した後のIL-10/Fcの血清濃度を経時的に測定した。血液試料は図示した間隔で眼窩穿刺法により採取した。IL-10/Fcの濃度は、ラット抗マウスIL-10 mAbを一次抗体とし、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたラット抗マウスIgG重鎖mAb複合体を酵素標識抗体とするELISA法によって測定した。

図6は、一連のFACSの結果を示したものであり、意図した通り、IL-10/FcのFc γ RIに対する結合活性は低いことがわかる。Fc γ RIの結合アッセイは、ヒトFc γ RIのcDNAを形質導入したCHO細胞（マウスFc γ RI、Fc γ RII、およびIL-10受容体を含まない）を用いて行った。Fc γ RIのIL-10/Fc++およびIL-10/Fcとの結合能は

FACSによって分析した。

図7は、IL-10/Fcが、500 μ gのLPSを注射した後のLPSの致死的作用に対する持続的な防御作用を及ぼすことを示したものである。この図は、BALB/cマウスの6つの実験群の生存率を示している。(i) rIL-10を30分間投与したマウス12匹、(ii) 2000 UのIL-10/Fcを30分間投与したマウス12匹、(iii) 4000 UのIL-10/Fcを24時間投与したマウス12匹、(iv) リン酸緩衝生理食塩水を30分間投与したマウス12匹、(v) 0.6 μ gのmIgG2aを30分投与したマウス6匹、(vi) 4000 UのrIL-10を24時間投与したマウス12匹。

図8は、IL-10/Fcによって、住血吸虫感染マウスの肝内の肉芽種のサイズがダウンレギュレートされたことを示すヒストグラムである。

図9は、IL-10/Fcによって、非肥満性糖尿病 (NOD) マウスにおける糖尿病の発症が防止されたことを示すグラフである。

図10は、IL-10/Fcによって、NODマウスにおける糖尿病の発症が防止されたことを示すグラフである。

図11は、IL-10/Fcの投与を受けたマウスが、サプレッサー性（抗糖尿病誘発性の）リンパ球に対して認容性であることを示すグラフである。

図12は、非溶解性マウスIL-4/Fcキメラ型サイトカインを作製することを目的と

して、マウスIL-4およびマウスFc γ 2a遺伝子のcDNAを遺伝的に融合するために用いた模式図である。Fc γ 2a断片のCH2ドメインには、部位特異的突然変異誘発法により、Glu 318、Lys 320、およびLys 322をアラニン残基に置換する変異を作成した。また、IL-4/Fcキメラタンパク質がADCCおよびCDCを引き起こす能力を無効化するため、Leu 235はグルタミン酸に置換した。本明細書ではこれ以後、この非溶解性のキメラタンパク質を「IL-4/Fc」と表記する。この溶解性のキメラタンパク質（変異を加えていないもの）は「IL-4/Fc++」と表記する。

図13は、CTLL-2増殖アッセイ系における細胞への³Hの取り込み量と、アッセイ系に添加した組換えIL-4またはIL-4/Fcの濃度との関係をプロットしたものである。組換えIL-4およびIL-4/Fcは、ELISA法によって測定したIL-4のモル濃度と同

じモル濃度で使用した。

図14は、非溶解性のIL-4/Fcの循環血中半減期が25時間であることを示すグラフである。

図15は、非溶解性のIL-4/Fcによって、住血吸虫感染マウスの肝内の肉芽腫のサイズがダウンレギュレートされたことを示すヒストグラムである。

略号

本明細書においては、以下の略号を用いる。

ADCC 抗体依存性細胞障害

CDC 補体依存性細胞障害

CMV サイトメガロウイルス

Con A コンカナバリンA

GM-CSF 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子

HBSS ハンクス平衡塩類溶液

IL インターロイキン

NOD 非肥満性糖尿病

PBS リン酸緩衝食塩水

TNF 腫瘍壊死因子

本発明の詳細な実施例を提供する前に、本発明の要素のいくつかを説明する。

キメラ型サイトカイン：酵素的に不活性な一つのポリペプチド（例えば溶解性

または非溶解性のIgG Fc領域）と結合した一つのサイトカイン（例えばインターロイキン）を有するキメラタンパク質を作製するためには、通常の分子生物学的手法を用いることができる。本発明の酵素的に不活性なタンパク質には、多数のポリペプチドが適する。好ましくは、このタンパク質は、分子量が少なくとも10 kDであり、pH6.8において総電荷が中性であり、球状の3次構造を持ち、ヒト由来であり、サイトカイン受容体（例えばIL-10受容体）以外の表面受容体との結合能はない。酵素的に不活性なポリペプチドがIgGである場合、好ましくは、IgGの部分はグリコシル化されている。必要に応じて、酵素的に不活性なポリペプチドには、キメラタンパク質がIgGヒンジ領域と結合したサイトカインであり、こ

のヒンジ領域が寿命延長性のポリペプチドと結合するように位置する、IgGヒンジ領域を含むことができる。このため、このヒンジ領域はサイトカインと寿命延長性のポリペプチドとの間のスペーサーの役割を果たすことができる。当業者は、IgG2a分泌性のハイブリドーマ（例えばHB129など）またはその他の真核細胞もしくはバキュロウイルス系から、容易にこれらの分子を作製することができる。IgGヒンジ領域を用いる代替りの方法としては、本明細書において定義した通り、可動性のポリペプチド・スペーサーを用いることができる。通常の分子生物学的手法を用いると、サイトカインと寿命延長性のポリペプチドとの間にこのようなポリペプチドを挿入することができる。

酵素的に不活性なポリペプチドにFc領域を含める場合には、必要に応じて、それが補体と結合する能力またはFc受容体と高い親和性で結合する能力を抑制するために、Fc領域に変異を加えることもできる。マウスのIgG Fcについては、Glu 318、Lys 320、およびLys 322をアラニン残基と置換することにより、このタンパク質はADCCを引き起こすことができなくなる。Leu 235をグルタミン酸に置換すると、このタンパク質の高い親和性でFc受容体と結合する能力は抑制される。ヒトIgGについては適切な変異も知られている（例えば、Morrisonら、1994, *The Immunologist* 2:119-124、およびBrekkeら、1994, *The Immunologist* 2:125を参照）。このタンパク質のこれらの活性を阻害するために、その他の変異を導入することもでき、また、このタンパク質が補体と結合する能力またはFc受容体と結合する能力を測定するために当業者に周知の方法を用いることもできる。使用できる

その他の酵素的に不活性なポリペプチドには、アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）、トランスフェリン、変異によって不活性化したt-PAなどの酵素、および循環血中半減期が長く、ヒト体内で酵素的に不活性なその他のタンパク質が含まれる。

多数のサイトカインがすでにクローニングされており、本発明に用いることができる。キメラタンパク質の作製を目的として、希望するサイトカインをコードしている遺伝子をベクターにサブクローニングするためには、通常の手法を容易

に用いることができる。例えば、マウスIL-10遺伝子の配列は記載されており (Mooreら、1990, Science 248:1230-1234)、ヒトIL-10遺伝子もクローニングされている (例えば、参照として本明細書に組み入れられる、米国特許出願第5,231,012号を参照)。また、ヒトIL-4もクローニングされている (Yokataら、1986, PNAS 83:5894)。必要に応じて、このサイトカインは、サイトカインの機能を評価する通常の方法によって決定される有用な生物学的機能を保持している限りにおいて、切断することも変異を導入することもできる。

好ましくは、キメラタンパク質の作製に使用される酵素的に不活性なポリペプチド (例えばIgG Fc) は、それ自体で、インビボでの循環血中半減期がサイトカイン (例えばIL-10) のそれよりも長い。さらに好ましくは、キメラタンパク質の半減期は、サイトカイン単独のそれよりも少なくとも2倍である。最適には、キメラタンパク質の半減期は、サイトカイン単独のそれよりも少なくとも10倍である。キメラタンパク質の循環血中半減期は、キメラタンパク質を投与された患者から採取した血清試料のELISA法において測定することができる。このようなELISA法においては、サイトカインに対する抗体を一次抗体として用いることができ、また、酵素的に不活性な蛋白質に対する抗体を酵素標識抗体として用いることができ、これにより、試料中のキメラタンパク質のみを検出することができる。ELISA法を実施するためには通常の方法を用いることができ、このようなELISA法の詳細な一例を本明細書では提供している。

キメラタンパク質は、組換えDNA技術を用いる通常のタンパク質発現の方法を用いて合成することができる (例えば哺乳類細胞において)。キメラタンパク質を作製するために用いるポリペプチドの多くはすでに精製されているため、本発明

のキメラタンパク質を精製するために、タンパク質の精製に関してすでに記載されている方法の多くを、その他の通常の方法とともに用いることができる。必要に応じて、キメラタンパク質は、サイトカインに対する抗体を用いる標準的なプロトコールに従ってアフィニティ精製を行うことができる。キメラタンパク質を通常免疫アフィニティ法によって精製するために、酵素的に不活性な蛋白質に

対する抗体を用いることもできる。必要に応じて、キメラタンパク質の活性を、サイトカイン単独の活性の試験に一般的に使用されている方法を用いて測定することもできる。キメラ型サイトカインの活性は、サイトカイン単独の活性と同じである必要はない。例えば、キメラ型サイトカインの活性は、サイトカイン単独の活性より高くても低くてもよい。

キメラ型サイトカインの治療的利用

本発明のキメラ型サイトカインは、患者における敗血症、敗血性ショック、肉芽腫形成、I型糖尿病、多発性骨髄腫、細菌性または真菌性の感染症、ウイルス関連性の癌（例えばバーキットリンパ腫）、およびその他の特定の癌を含む種々の疾患の治療または発症抑制（完全な予防を含む）のために用いることができる。キメラ型サイトカインの治療的用途は、半減期延長性の酵素的に不活性なポリペプチドの非存在下におけるサイトカインの治療的用途と対応している。このため、本発明のキメラ型サイトカインは、本明細書に要約したようなすでに数多く記載されている適用法において使用される、対応するサイトカインと置換することができる。

サイトカインがIL-10である場合、IL-10キメラ体を含む治療用組成物は、敗血症または敗血性ショックの治療または抑制のために患者に投与することができる。サイトカインがIL-10またはIL-4である場合、キメラ型サイトカインは、肉芽腫性疾患（例えば住血吸虫症）、クローン病（すなわち限局性腸炎）、多発性硬化症、乾癬、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、虹彩炎、炎症性腸疾患、およびベック病（サルコイドーシス）の治療または発症抑制のために用いることができる。IL-5キメラ体は、住血吸虫症などの肉芽腫性疾患の治療に用いることができ、また、IL-5キメラ体は、末梢血好酸球による抗体媒介性の腫瘍細胞死を誘導するために用いることもできる。これらのキメラ体は、IgA産生、および好

酸球の増殖を促すためにも有用である。サイトカインがIL-6である場合、キメラ型サイトカインは多発性骨髄腫、乳癌、および悪性黒色腫の治療、ならびに神経、細胞障害性T細胞、およびB細胞の分化の誘導に特に有用である。また、IL-6キ

メラ体は、抗ウイルス活性を有し、ハイブリドーマおよび肝細胞の増殖を誘導することでも有用である。腫瘍壊死因子（例えばTNF- α またはTNF- β ）を含むキメラ型サイトカインは、パピローマウイルスの感染に起因する子宮頸部癌、肝炎ウイルスの感染に起因する肝癌、ヘルペスウイルスの感染に起因する皮膚発疹の治療または抑制に有用である。IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、およびIL-15は、血液学的欠損症に対する成長因子として用いることができ、これらは放射線照射療法または化学療法における合併症に対する防御または回復の促進のために有用である。キメラタンパク質の機能のその他の例には、IL-2またはIL-15のキメラ体による活性化T細胞、B細胞、LAK細胞、およびNK細胞の増殖の促進が含まれる。また、IL-3キメラ体は、多能性の造血前駆細胞の増殖促進およびAZT治療に伴う造血器系毒性の抑制に有用である。GM-CSFキメラ体は、好中球およびマクロファージの増殖および分化の促進、ならびにマクロファージの活性化のために用いることができる。その他のキメラ型サイトカインの活性には、IL-7キメラ体による未成熟B細胞およびT細胞の増殖誘導が含まれる。

キメラタンパク質のFc領域が溶解性である場合、そのキメラタンパク質は多発性骨髄腫の治療に特に有用である。溶解性のFcキメラ体は、患者の体内からサブレッサー性リンパ球を除去し、慢性免疫を抑制するために用いることができる。また、溶解性のFcキメラ体は、ウイルスに起因する種類などの癌を治療するために用いることもできる。例えば、本発明の溶解性のFcキメラ体は、腎細胞癌、悪性黒色腫、リンパ腫、パピローマウイルスと関連する子宮頸部癌、またはカポジ肉腫の治療に用いることができる。さらに本発明は、B型肝炎またはC型肝炎に伴う感染に起因する肝癌の治療に用いることができる。本発明は、バーキットリンパ腫などの、エプスタイン・バール (Epstein Barr) ウイルスに起因するリンパ腫の治療にも有用である。

溶解性のFc領域を含むキメラ型サイトカインは、後天性免疫不全症候群 (AIDS) と関連した感染症などの、免疫抑制系に起因する慢性感染症を治療するために

用いることができる。AIDSと関連した感染症の一般的にみられる例には、原生動物（例えば、*Pneumocystis carinii*、*Toxoplasma gondii*、および*Cryptosporidi*

um)、真菌(例えば、*Candida sp.*および*Cryptococcus neoformans*)、ウイルス(例えばサイトメガロウイルス、単純疱疹ウイルス、および带状疱疹ウイルス)、細菌(例えば、*Mycobacterium avium-intracellulare*、および*Mycobacterium tuberculosis*)の感染が含まれる。このような感染症は、肺炎、中枢神経系障害、下痢、食道炎、髄膜炎、網膜炎、または大腸炎の原因となる。

本発明は、種々の放線菌種による、AIDSとは関連しない感染症の治療にも用いることができる。これらの細菌は多くの疾患の原因因子となる。例えば、マイコバクテリア・チューバキュロシス(*M. tuberculosis*)の感染は結核の原因となる。マイコバクテリア・アブセッサス(*M. abscessus*)は膝の外傷性感染の原因となる。マイコバクテリア・ボビス(*M. bovis*)はウシにおける結核の主要な原因であり、ヒトおよび他の動物に伝染性がある。マイコバクテリア・イントラセルレア(*M. intracellulare*)はヒトの肺損傷と関連がある。マイコバクテリア・カンサシ(*M. kansasii*)は、結核に類似した肺疾患の原因となり、また、脾臓、肝臓、膵臓、精巣、関節、およびリンパ節における感染症および通常は病変の原因となる。マイコバクテリア・レプラ(*M. leprae*)はハンセン病の原因となる。マイコバクテリア・スクロフラセウム(*M. scrofulaceum*)は、小児における頸部炎症、およびハンセン病患者における病変と関連がある。マイコバクテリア・ウルセランス(*M. ulcerans*)は、ヒトにおけるブルーリ潰瘍の原因となる。

本発明は、急性および慢性皮膚型、粘膜皮膚型、および内臓型を含むリーシュマニア症を治療するために用いることもできる。「*L. major*」、「*L. tropica*」、種々の系統の「*L. mexicana*」、「*L. braziliensis*」、および「*L. donovani*」などの種によって引き起こされるこれらの感染症は、全身のいたる部位に生じる病変および潰瘍の原因となる。

本発明のキメラタンパク質を含む治療用組成物は、標準的プロトコルに従って、キメラタンパク質と、水または生理食塩水などの薬学的に許容される担体とを混合することにより、製剤化することができる。必要に応じて、複数のキメラタンパク質を、順次もしくは同時に患者に併用して投与することもできる(例えば

肉芽腫形成の治療のために、まずIL-10/Fcを投与し、続いてIL-4/アルブミンを

投与する、など)。キメラタンパク質は患者に対して、静脈内、腹腔内、筋肉内、および／または皮下に投与することができる。一般的に、キメラタンパク質は、 $1\mu\text{g/kg}$ 体重から 500mg/kg 体重までの用量を用いることができる。好ましくは、用量は $10\mu\text{g/kg}$ 体重から 100mg/kg 体重までの範囲である。好ましくは、キメラタンパク質は、疾患の発症前または最初の徴候が出現した時点で投与する。必要に応じて、キメラタンパク質を疾患の徴候が現れる前から投与することもできる。当業者は、投与の用量および頻度を必要に応じて調節することができるであろう。一般的に、キメラタンパク質の投与間隔は12時間である。治療の効果は、一般的に知られた疾患の徴候に関する患者のモニタリング、またはキメラタンパク質の存在に関する患者の体液（例えば血清）の試料の分析によって判定する。

敗血性ショックの抑制：IL-10ポリペプチドと（ヒトにおいて）酵素的に不活性で、サイトカインの循環血中半減期を少なくとも2倍に延長させるポリペプチドとを結合したキメラタンパク質の治療的有效量を患者に投与することによって、患者（例えばヒト）における敗血性ショックを治療または抑制することができる。例えば、IL-10ポリペプチドがIgGのヒンジ領域と結合し、このヒンジ領域が溶解性または非溶解性のIgG Fc領域と結合しているキメラタンパク質を用いることができる（本明細書では、これらのポリペプチドをそれぞれIL-10/Fc++、IL-10/Fcと表記している）。このキメラタンパク質は、患者に対して投与（例えば静脈内投与）するために、生理食塩水などの薬学的に許容される担体中において製剤化することができる。一般的に、用量は 0.01mg/kg から 500mg/kg までで十分である。好ましくは、用量は $10\mu\text{g/kg}$ から $100\mu\text{g/kg}$ までの範囲である。必要に応じて、投与方式の効果を、患者の敗血性ショックのモニタリングのための通常の方法を用いて評価することもできる。

投与は、敗血症もしくは内毒素血症と診断された、または疑われた時点で開始し、患者の病状の安定化が得られるまで12時間間隔で投与を繰り返す。このような評価は、ELISA法によって血清TNFレベルが検出不能になることに基づいて行うことができる。患者の病状は、循環血中のキメラタンパク質の濃度を4時間間隔で測定することによってもモニターすることができる。キメラタンパク質の濃度は

、サイトカインに対する抗体を一次抗体とし、酵素的に不活性な蛋白質に対する抗体を酵素標識抗体として用いる二点ELISA法 (two-point ELISA) によっても測定することができる。

糖尿病の発症抑制：本発明のキメラ型IL-10およびIL-4分子のいずれも、糖尿病の治療または発症抑制の目的で、患者（例えばヒト）に投与することができる。このキメラタンパク質は、このキメラタンパク質と薬学的に許容される担体（例えば生理食塩水）とを混合することにより、治療用組成物として製剤化することができる。通常の方法を用いることにより、このような治療用組成物を、腹腔内、静脈内、皮下、または筋肉内に投与するために製剤化することができる。好ましくは、この治療用組成物は、抗 β 細胞に対する自己免疫および／または糖代謝における前糖尿病性変化（すなわち、耐糖能試験における初期的異常）が発見された後直ちに患者に投与され、投与は2日毎または少なくとも週1回の一定の頻度で行う。キメラタンパク質の好ましい用量は、投与を受けた患者の血糖値、抗 β 細胞自己抗体の濃度、または耐糖能試験における異常をモニターするための標準的な手法を用いることにより決定する。ヒトについては、キメラタンパク質の用量は $1\mu\text{g/kg}$ 体重から 500mg/kg 体重までで十分である。一般的に、好ましい用量は $1\mu\text{g/kg}$ から $200\mu\text{g/kg}$ の範囲である。さらに好ましくは、用量は約 $50\mu\text{g/kg}$ である。

癌の治療：本発明の溶解性のキメラタンパク質は、ヒトの種々の癌、例えば多発性骨髄腫の治療に有用である。例えば、天然型のIL-10はIL-6および腫瘍壊死因子の産生を抑制することが知られている。多発性骨髄腫はIL-6が、疾患に関与する多くの細胞に対して自己分泌増殖因子として機能する、形質細胞の悪性疾患である。さらに、多発性骨髄腫細胞はIL-10受容体を保持しており、このためIL-10/Fc++キメラタンパク質のIL-10部分は、このタンパク質を標的として腫瘍細胞に到達し、その結果、腫瘍細胞はキメラ体の溶解性Fc領域によって溶解される。本発明のこの面において、薬学的に許容される担体およびキメラ型サイトカイン（例えばIL-10/Fc++）から成る治療用組成物を、多発性骨髄腫と診断された患者に投与する。同様に、その他の溶解性のキメラ型サイトカインを、キメラ体のサイトカイン部分に対する受容体を保持する細胞から成る腫瘍を治療するために

用

いることができる。

以下に、患者における敗血性ショックの予防（すなわち、発症の完全な抑制）、肉芽腫形成（例えば住血吸虫症）の抑制、および糖尿病患者の発症予防を目的とした、本発明のキメラタンパク質の使用に関する詳細な実施例を提示する。

IL-10/Fcによる敗血性ショックの治療

IL-10/Fcの遺伝的構築：マウスIL-10およびマウスFc γ 2aの相補鎖DNAをコンカナバリン（Con A）で刺激したマウス脾細胞（C57BL/6J；Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）およびIgG2a分泌性のハイブリドーマ（American Type Culture Collection HB129, Rockville, MD）からそれぞれ抽出したmRNAから、逆転写酵素MMLV-RT（Gibco BRL, Grand Island, NY）およびoligo-dT₍₁₂₋₁₈₎オリゴヌクレオチド（Gibco BRL）を用いて作製した。それからIL-10のcDNAを、IL-10に特異的な合成オリゴヌクレオチドを用いるPCRによって増幅した。5'ヌクレオチドには、独自のNotI制限部位を翻訳開始コドンの40ヌクレオチド5'側に挿入し、3'オリゴヌクレオチドについては、終止コドンを除いた後、IL-10/Fcの接合部位に独自のBamHI部位を作製するために、C端のセリンコドンAGCをTCGに変更した。Fc γ 2aドメインのcDNAを増幅するために用いた合成オリゴヌクレオチドについては、独自のBamHI部分をヒンジの最初のコドンとし、終止コドンの3'側に独自のXbaI部分を導入するために、ヒンジの最初のコドンをGluからAspに変更した。

非溶解性のIL-10/Fcオリゴヌクレオチドのための構築物を作製するために、部位特異的突然変異誘発を用いて、FcのC1q結合性モチーフのGlu 318、Lys 320、およびLys 322をAla残基に置換した。同様に、Fc γ RI結合部位を不活性化するためにLeu 235をGluに置換した。IL-10およびFc γ 2aの成分を独自のBamHI部位で正しい翻訳リーディングフレームにおいて結合することにより、合計13のシステイン残基を伴う411アミノ酸から成る単一のポリペプチド（IL-10シグナルペプチドの18アミノ酸を含む）をコードする1,236 bp長のオープンリーディングフレームが得られた（図1）。成熟し、分泌されたホモダイマー型のIL-10/Fcは、最大8つの分子内ジスルフィド結合、および3つの重鎖間ジスルフィド結合を有すると

推測され、グリコシル化を考慮しない分子量は90.1 kDと推測される。

IL-10/Fcの発現および精製：IL-10/Fc++（野生型のFc γ 2a配列を持つタイプ）

およびIL-10/Fcの両方が適切な遺伝的構成を持つことは、融合遺伝子をNotI-Xba Iカセットとして真核細胞発現性プラスミドpRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) に挿入してクローニングした後、DNA塩基配列分析により確認した。このプラスミドは、CMVプロモーター／エンハンサー、ウシ成長ホルモンポリアダニル化シグナル、およびG418による選別のためのネオマイシン耐性遺伝子を含む。IL-10/Fc++またはIL-10/Fcの融合遺伝子を載せたプラスミドを、電気穿孔法（1.5 kV / 3 μ F / 0.4 cm / PBS）によってチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-K1）に形質導入し、G418 (Geneticin, Gibco BRL) 1.5 mg/mlを添加した無血清Ultra-CHO培地 (BioWittaker Inc., Walkerville, MD) において選別した。サブクローニング後、キメラタンパク質を高いレベルで産生したクローンを、IL-10に関するELISA法によって上清をスクリーニングすることにより選別した。IL-10/FcおよびIL-10/Fc++キメラタンパク質は、培養上清をプロテインAセファロースアフィニティクロマトグラフィーで処理した後、PBSに対する透析および0.22 μ mの濾過滅菌を行うことにより精製した。精製したタンパク質は、使用時まで-20℃で保存した。

サイズ、ならびにIL-10およびFc γ 2aアイソタイプの特異性の確認：還元条件（+DTT）および非還元条件（-DTT）におけるSDS-PAGE後に、抗マウスIL-10モノクローナル抗体（PharMingen）または抗マウスFc γ ポリクローナル一次抗体（Pierce, Rockford, IL）を用いてウェスタンブロット分析を実施した。図2に示した通り、IL-10/Fcキメラタンパク質はいずれも還元条件（+DTT）において、推定分子量45 kDの単一の種類として移動した。非還元条件（-DTT）においては、いずれのIL-10/Fcも分子量91 kDの単一の種類として移動し、このキメラタンパク質がホモダイマー体として集合化することを示した。さらに、IL-10/Fc融合タンパク質は、抗mIL-10 mAb（図2B）および抗mIgG重鎖ポリクローナル抗体（図2A）の両方と結合したことから、IL-10部分を含むサイトカインの特異性、およびFc γ 2aドメインアイソタイプの特異性が確かめられた。

rIL-10およびIL-10/Fcの生物学的活性の標準化：上記の方法と同じRT-PCR法および同じ5'NotIセンスオリゴヌクレオチド・プライマーを用いて、本来の終止コドンの3'側にXbaI制限部位を加えたmIL-10のcDNAをpRc/CMVに挿入してクローニングした。それから、DEAEデキストラン法を用いてこの構築物をCOS細胞において一

過性に発現させ、無血清「UltraCulture」培地（BioWhittaker社）において増殖させた。第5日に培養上清を滅菌し、組換えIL-10（rIL-10）の材料とするために-20℃で保存した。市販のrIL-10（PharMingen）に基づく検量線を用いて、IL-10/FcおよびrIL-10の濃度を、まずELISA法により、それからバイオアッセイにより測定した。ELISA法に基づくユニット活性は、マウス肥満細胞株（MC/9）を用い、rIL-4（PharMingen）を同時刺激因子として用いる標準的なIL-10バイオアッセイの結果と対応する（例えば、Thompson-Snipesら、1991, J.Exp.Med. 173:507を参照）。

IL-10/Fcのインビトロにおける特徴決定：IL-10/Fcの機能的活性を、2つの独立したアッセイ法によって評価した。第一に、IL-10/Fcが、LPSで刺激されたマクロファージによるIL-6の分泌を抑制する能力を測定した。このアッセイにおいては、種々の用量のrIL-10もしくはIL-10/Fcの存在下または非存在下におけるマウス単球／マクロファージPU5-1.8細胞の培養上清中のIL-6のレベルをELISA法によって測定した（例えば、Fiorentinoら、1991, J.Immunol. 147:3815）。図3に示した通り、IL-10/Fcは、LPSにより誘導されるPU5-1.8細胞によるIL-6の分泌を用量依存的に抑制した。

MC/9肥満細胞のIL-4依存的な増殖に対するIL-10の増強能力もアッセイした。このアッセイにおいて、本発明者は、中和性の抗マウスIL-10mAb（Biosource International, Camarillo, CA;例えば、Thompson-Snipes, 1991, J.Exp.Med. 173:507を参照）の存在下または非存在下において、100 U/mlのrIL-10またはIL-10/Fcの存在下で増殖したMC/9肥満細胞への³H]-チミジンの取り込みを測定した。FcγRI結合アッセイは、ヒトFcγRIのcDNAを形質導入したCHO-K1細胞を用いて実施した。FcγRI、FcγRII、およびIL-10を欠損したマウスCHO細胞は、ヒトFcγR

IをコードするcDNAを載せた、PvuIにより直鎖状にされた $20\mu\text{g}$ のpRc/CMVを用いる電気穿孔法により形質導入した。CHO/Fc γ RI細胞 (5×10^5) はFOM緩衝液 (0.1% FCS (BioWhittaker Inc.) および0.1% アジ化ナトリウムを含むPBS) で2回洗浄し、それから $10\mu\text{g/ml}$ のマウスIgG2a (Cappel, West Chester, PA)、IL-10/Fc、またはIL-10/Fc++とともにインキュベートした。氷上で60分間インキュベートした後、細胞を収集し、FOM緩衝液で洗浄した後、蛍光色素を結合したポリクローナル

ヤギ抗マウスIgG抗体とともに暗所で60分間インキュベートした。細胞を洗浄し、1%ホルマリン/PBS溶液中にて4℃で保存し、FACStarセルソーター (Becton-Dickinson, San Jose, CA) を用いて分析した。図4に示したデータは、rIL-10に関してすでに指摘したことと同じように、IL-10/Fcがマウス肥満細胞株MC/9のIL-4依存的な増殖を増強することを示しており、この同時刺激作用が中和性の抗IL-10mAbによって阻害されることを示している。このため、IL-10と同じモル数に基づく場合、IL-10/Fcはこれらの2種類のバイオアッセイ法においては、rIL-10と等価な生物学的機能を有する。

IL-10/Fcの循環血中半減期の決定：IL-10/Fcの循環血中半減期を測定するために、8週齢から10週齢までのBALB/cマウス (Jackson Laboratory) 計6匹に対して、キメラタンパク質の単回静脈内注射を行い、その後のIL-10/Fcの血清濃度を経時的に測定した。マウスにIL-10/Fcを投与して0.1、6、24、48、72、および96時間後に、眼窩穿刺法により $100\mu\text{l}$ の血液試料を順次採取した。IL-10/Fcの循環血中半減期の測定は、このアッセイの結果が、IL-10またはmIgG2aではなくIL-10/Fcに特異的となるように、ラット抗マウスIL-10 mAbを一次抗体として用い、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したラット抗マウスFc γ 2aモノクローナル抗体 (PharMingen) を酵素標識抗体として用いるELISA法によって行った。IL-10/Fcの循環血中半減期は31時間であることが示された (図5)。すなわち、IL-10/FcはIL-10の生物学的機能を有しており、循環血中半減期はそれよりも長い。さらに、Fc γ 2のCH2ドメインに特異的な変異を導入したことにより、Fc γ RIに対する結合能力は大きく低下した (図6) (例えば、Duncanら、1988, Nature 332-563を

参照)。さらに、本発明者は、C1q結合部位に導入した変異のために、Fc γ 2aドメインが補体を活性化する能力が大きく低下することを発見した。したがって、IL-10/FcがCDCを補助する能力は除去されている。

LPS誘発性の敗血性ショック：敗血性ショックの治療または抑制に関するIL-10/Fcの能力を測定するため、8週齢から10週齢までの雌BALB/cマウスに対して、IL-10/Fc、rIL-10、mIgG2a、またはPBSのみを前投与し、それから500 μ gのLPSを各々のマウスに静脈内注射した。合計24匹のマウスに対し、2000 UのIL-10/Fc (12匹) または2000 UのrIL-10 (12匹) を腹腔内注射し、30分後にLPSを投与した。
第

2の実験では、12匹のマウスのそれぞれに4000 UのIL-10/FcまたはrIL-10を投与し、24時間後にLPSを投与した。対照実験においては、実験動物に対して、同一質量濃度のmIgG2a (n=6) または等容量のPBS (n=12) を投与し、30分後にLPSを投与した。評価のエンドポイントは生存の可否とした。

図7に示す通り、PBSまたはmIgG2aを投与されたマウスに対して72時間以内に500 μ gのLPSを単回投与すると、一様に致死性であった。LPSを投与する30分前に2000 UのIL-10/FcまたはrIL-10を投与されたマウスの生存率は50%であった。LPSを投与する24時間前に4000 UのrIL-10を投与されたマウスはすべて死亡したが、4000 UのIL-10/Fcの前投与を受けたマウスの生存率は50%であった。これらのデータは、LPSを投与する30分前に投与した場合には、IL-10/FcおよびrIL-10が、LPSの致死的作用に対して同様なレベルの防御効果を持つことを示している。rIL-10とは対照的に、IL-10/Fcは、LPSを投与する24時間前に投与した場合にも、長期的な防御効果を示した。この所見は、rIL-10と比較してIL-10/Fcの循環血中半減期が長いことと一致する。このため、これらのデータは、本発明のキメラ型分子が、よく知られた疾患モデル動物における敗血性ショックに対して、長期的な防御効果を持つことを示している。

IL-10/Fcは住血吸虫感染マウスにおける肉芽腫形成をダウンレギュレートする
：本発明者は、IL-10/Fcが、住血吸虫が感染した動物における肉芽腫形成を抑制することも発見した。これらの試験では、雌のC57BL/6マウスにシストソーマ・

マンソニ (*Schistosoma mansoni*) (プエルトリコ系統) のセルカリア60匹を感染させた。感染から4週後に、マウスを以下の3つの実験群のいずれかに無作為に割り当てた。

- (i) 何も投与しないマウス5匹
- (ii) mIgG3を投与したマウス5匹
- (iii) IL-10/Fcを投与したマウス5匹

住血吸虫の感染から4週後に (ii) 群および (iii) 群のマウスに対して、以下の処方に従ってmIgG3またはIL-10/Fcを腹腔内注射した。投与第1日は $2\mu\text{g}$ /匹、それから3週間は $2\mu\text{g}$ /匹を毎日投与する。住血吸虫の感染から7週後に3つの実験群のすべてのマウスを屠殺した。それからマウスの肝をホルマリン固定し、通常

の組織病理学的手法を用いて処理した後、 $5\mu\text{m}$ 厚の切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施した。肉芽腫性炎症の程度は、コンピューター支援による形態計測分析により定量的に評価した。図8に示す通り、IL-10/Fcの投与により、マウスの肝における肉芽腫形成は抑制された。したがって、この住血吸虫感染モデル動物から得られたデータは、動物における肉芽腫形成を抑制するためにIL-10/Fcを用いることができることを示している。

IL-10/Fcによる糖尿病の予防または抑制：本発明のキメラ型IL-10タンパク質は、ヒト患者におけるI型糖尿病の治療または発症抑制のために有用である。以下の詳細な例では、ヒト糖尿病に関するよく知られた動物モデルである非肥満性糖尿病 (NOD) マウスを用いる。糖尿病に対するIL-10/Fcの効果を検討するために、合計30匹のマウスを以下の3つの実験群に振り分けた。

- (i) 何も投与しないマウス10匹
- (ii) mIgG3を投与したマウス10匹
- (iii) IL-10/Fcを投与したマウス10匹

投与はマウスが5週齢に達した後に開始した。(ii) 群および (iii) 群のマウスに対して、第1日は $2\mu\text{g}$ のmIgG3またはIL-10/Fcを腹腔内注射し、以後はマウスが19週齢に達するまで2日毎に $1\mu\text{g}$ のmIgG3またはIL-10/Fcを腹腔内注射した。糖尿病の診断は、通常の方法および基準に従って行った。

図9に示した通り、対照群マウス (mIgG3投与マウスおよび非処置マウス) の少なくとも50%が、20週の試験期間中に糖尿病を発症した。これに対して、IL-10/Fcを投与されたマウスでは、試験期間中の糖尿病の発症は完全に抑制された。よく知られたヒト糖尿病の動物モデルを用いて得られたこれらのデータは、IL-10/Fcが、動物 (例えばヒト) の糖尿病の予防または発症抑制に有用であることを示している。

糖尿病の発症抑制に関するIL-10/Fcの有用性を、NODマウスを用いる別の実験によって再確認した。合計19匹のマウスを以下の3つの実験群に振り分けた。

- (i) 何も投与しないマウス6匹
- (ii) mIgG2aを投与したマウス7匹
- (iii) IL-10/Fcを投与したマウス6匹

(ii) 群および (iii) 群のマウスについては、マウスが6週齢に達した後に投与を開始した。投与方式は、第1日に2 μ gのmIgG2aまたはIL-10/Fcを腹腔内注射し、以後はマウスが25週齢に達するまで2日毎に1 μ gのmIgG2aまたはIL-10/Fcを腹腔内注射することとした。糖尿病の診断は、通常の方法および基準に従って行った。

図10に示す通り、対照群マウス (mIgG2a投与マウスおよび非処置マウス) の少なくとも50%が、25週齢に達する前に糖尿病を発症した。これと極めて対照的に、IL-10/Fcを投与されたマウスは1匹も糖尿病を発症しなかった。52週齢の時点で、すでに投与は終了しているにもかかわらず、IL-10/Fcを投与された動物の84%では血糖値が正常範囲だった (すなわち、糖尿病を発症しなかった)。よく知られたヒト糖尿病の動物モデルを用いて得られたこれらのデータは、IL-10/Fcが、糖尿病の予防または発症抑制に有用であることを示している。また、これらのデータは、IL-10/Fcが糖尿病に対する長期的な防御効果を有することを示している。

IL-10/Fcが糖尿病の治療に有用であることを示すさらにほかの証拠は、IL-10/Fcを投与したマウスはサプレッサー性 (抗糖尿病誘発性) リンパ球に対して認容性があるという本発明者の発見に由来する。この有益な効果は、非キメラ型のIL

-10分子を投与した哺乳類においては報告されていない。この実験では、10週齢から12週齢までの雄のNODマウス（すなわち、レシピエント）25匹に対して、免疫系障害の原因となる放射線照射（700ラド）を行った。その後、マウスを以下の4つの実験群に振り分けた。

(i) 急性糖尿病を発症した雌のNODマウスの脾細胞 30×10^6 個と、何も投与されていない11週齢の共ドナーの脾細胞 30×10^6 個の混合物を投与したマウス9匹

(ii) 急性糖尿病を発症した雌のNODマウスの脾細胞 30×10^6 個と、mIgG3を投与された11週齢の共ドナーの脾細胞 30×10^6 個の混合物を投与したマウス7匹

(iii) 急性糖尿病を発症した雌のNODマウスの脾細胞 30×10^6 個と、IL-10/Fcを投与された11週齢の共ドナーの脾細胞 30×10^6 個の混合物を投与したマウス5匹

(iv) 急性糖尿病を発症した雌のNODマウスの脾細胞 30×10^6 個と、IL-10/Fcを投与された54週齢の共ドナーの脾細胞 30×10^6 個の混合物を投与したマウス4匹

NODマウスに対する投与は、マウスが5週齢に達した時点で開始し、第1日目に2

μ gのmIgG3またはIL-10/Fcを腹腔内注射し、以後はマウスが25週齢に達するまで2日毎に1 μ gのmIgG3またはIL-10/Fcを腹腔内注射した。細胞移植作業において起こる可能性のある抑制型の免疫現象を検出するために、投与群のマウスの一部を細胞ドナーとして用いた。

糖尿病の診断は、通常の方法および基準に従って行った。図11に示した通り、非処置マウスまたはmIgG3投与した共ドナーマウスの脾細胞を移植されたNODマウスの85%より多くが、脾細胞を移植して25日以内に糖尿病を発症した。IL-10/Fcを投与された11週齢または54週齢の共ドナーからの細胞移植を受けたマウスでは、糖尿病の発症が抑制された。これらのデータは、動物における糖尿病の発症は、IL-10/Fcの投与を受けた脾細胞をその動物に移植することによって抑制することができることを示している。このように、キメラ型のIL-10(例えばIL-10/Fc)によって得られる寛解は、非キメラ型のIL-10によって得られる一時的効果よりも持続的であるだけでなく、非キメラ型のIL-10を投与した際には認められない抗糖尿病性の抑制的免疫現象の形成をも伴っている。

IL-4/Fcによる肉芽腫形成の治療または予防

本発明者は、IL-4/Fcのマウスへの投与により、住血吸虫が哺乳動物に感染した際に通常起こる肉芽腫形成が抑制されることを発見した。したがって、IL-4/Fcは、患者における肉芽腫性炎症を抑制することに加え、住血吸虫症の抑制または予防のために用いることができる。

IL-4/Fcの遺伝的構築：マウスIL-4およびマウスFc γ 2aの相補鎖DNAをそれぞれ、コンカナバリンA (ConA) で刺激したマウス脾細胞 (C57BL/6J ; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) およびIgG2a分泌性のハイブリドーマ (American Type Culture Collection HB129, Rockville, MD) から抽出したmRNAから、逆転写酵素MMLV-RT (Gibco BRL, Grand Island, NY) および合成oligo-dT($_{12-18}$)オリゴヌクレオチド (GibcoBRL) を用いて作製した。

非溶解性のIL-4/Fcオリゴヌクレオチドのための構築物を作製するために、部位特異的突然変異誘発法を用いて、FcのC1q結合性モチーフのGlu 318、Lys 320、およびLys 322をAla残基に置換する変異を導入した。同様に、Fc γ RI結合部位を不活性化するためにLeu 235をGluに置換した (図12)。

IL-4/Fcの発現および精製：IL-4/Fcが適切な遺伝的構成を持つことは、融合遺伝子を真核細胞発現性のプラスミドpRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) に挿入してクローニングした後、DNA塩基配列分析により確認した。このプラスミドは、CMVプロモーター／エンハンサー、ウシ成長ホルモンポリアダニル化シグナル、およびG418による選別のためのネオマイシン耐性遺伝子を含む。IL-4/Fcの融合遺伝子を載せたプラスミドを、電気穿孔法 (1.5 kV/3 μ F/0.4cm/PBS) によってチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) に形質導入し、G418 (Geneticin, Gibco BRL) 1.5mg/mlを添加した無血清「Ultra-CHO」培地 (BioWhittaker Inc., Walkerville, MD) において選別した。サブクローニング後、キメラタンパク質を高いレベルで産生したクローンを、IL-4に関するELISA法によって上清をスクリーニングすることにより選別した。IL-4/Fcキメラタンパク質は、培養上清をプロテインAセファロースアフィニティクロマトグラフィーで処理した後、PBSに対する透析および0.22 μ mの濾過滅菌を行うことにより精製した。精製したタンパク質は、使用時まで-20℃で保存した。

IL-4/FcによるCTLL-2増殖アッセイ：IL-4/FcのIL-4部分の機能は、通常のCTLL-2増殖アッセイ法によって評価した。このようなアッセイ系においては、培養系に対するIL-4の投与により、細胞は増殖し、この増殖を細胞内への $[^3\text{H}]$ 取り込みによって評価することができる。IL-4/Fcの機能に関するこの追加試験によって得られたデータは、IL-4/Fcに反応して起こる細胞の増殖が、一定の濃度の範囲にわたり、組換えIL-4に反応して起こる細胞の増殖と実質的に平行関係にあることを示している（図13）。

IL-4/Fcの循環血中半減期の決定：本発明者は、IgGの非溶解性Fc領域にIL-4を結合させることにより、IL-4の循環血中半減期を延長することができることを発見した。この実験では、マウスにIL-4/Fc（8mg）の単回静脈内注射を行い、その後の非溶解性のIL-4/Fcの血清濃度を経時的に計測した（図14）。血液試料はマウスの眼窩穿刺法により採取した。非溶解性のIL-4/Fcの濃度は、ラット抗マウスIL-4抗体を一次抗体として用い、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したラット抗マウスIgG重鎖モノクローナル抗体を酵素標識抗体として用いるELISA法により測定した。これらのデータからは、IL-4/Fcの循環血中半減期が約25時間であること

が示された。

IL-4/Fcはインビボにおいて住血吸虫による肉芽腫形成を抑制する：雌のC57BL/6マウスに、シストソーマ・マンソニ（*Schistosoma mansoni*）（プエルトリコ系統）のセルカリア60匹を感染させた。感染から4週後に、マウスを以下の3つの実験群のいずれかに無作為に割り当てた。

- (i) 何も投与しないマウス5匹
- (ii) mIgG3を投与したマウス5匹
- (iii) IL-4/Fcを投与したマウス5匹

住血吸虫の感染から4週後に（ii）群および（iii）群のマウスに対して、以下の処方に従ってmIgG3またはIL-4/Fcを腹腔内注射した。投与第1日は2500U/匹、それから3週間は1250U/匹を毎日投与する。住血吸虫の感染から7週後に3つの実験群のすべてのマウスを屠殺した。それからマウスの肝をホルマリン固定し、通

常の組織病理学的手法を用いて処理した後、 $5\mu\text{m}$ 厚の切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施した。肉芽腫性炎症の程度を、コンピューター支援による形態計測分析により定量的に評価した。図15に示す通り、IL-4/Fcの投与により、マウスの肝における肉芽腫形成は抑制された。したがって、この住血吸虫感染モデル動物から得られたデータは、動物（例えばヒト）における肉芽腫形成を抑制するためにIL-4/Fcを用いることができることを示している。

その他の態様は、以下の請求の範囲において記載する。例えば、抗体のFc領域の補体結合能力を失わせるためには、事実上どのような変異を用いることも可能である。

【図1】

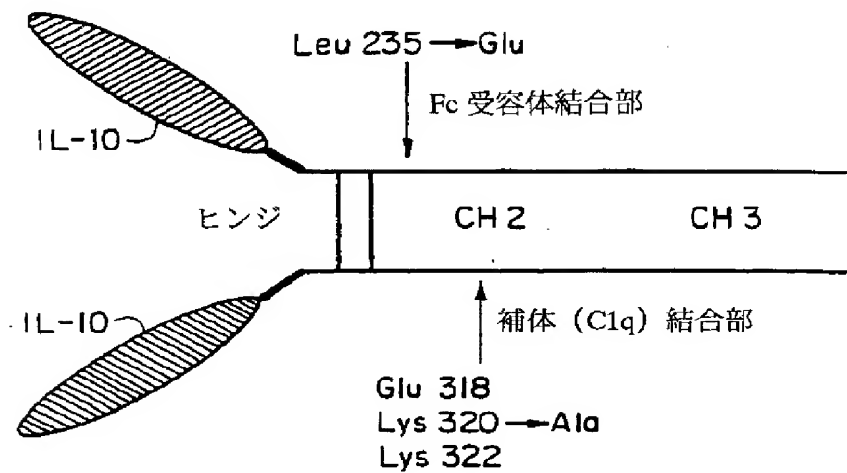


図 1

【図3】

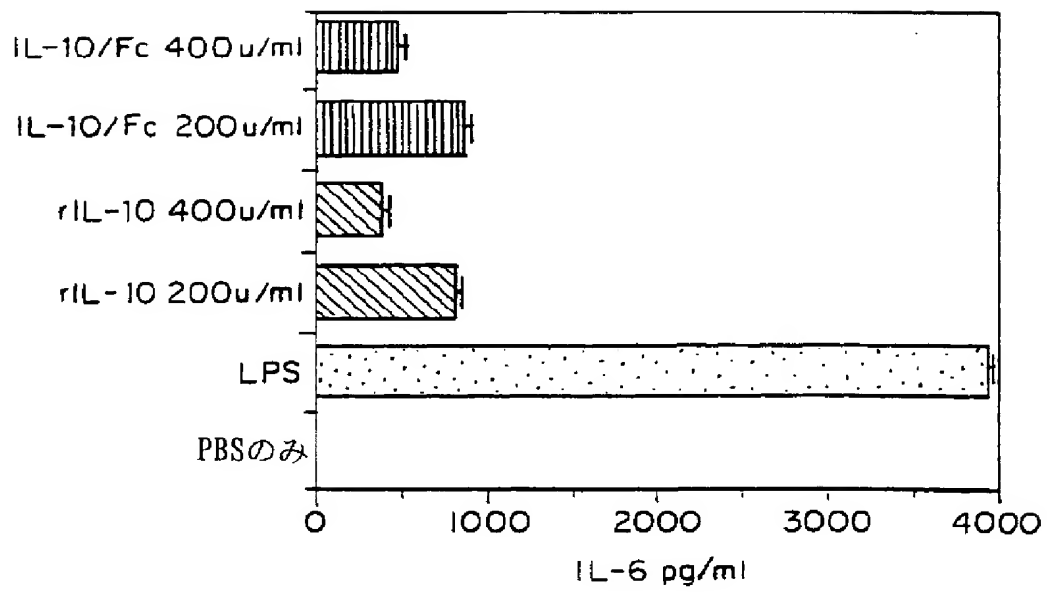


図 3

【図2】

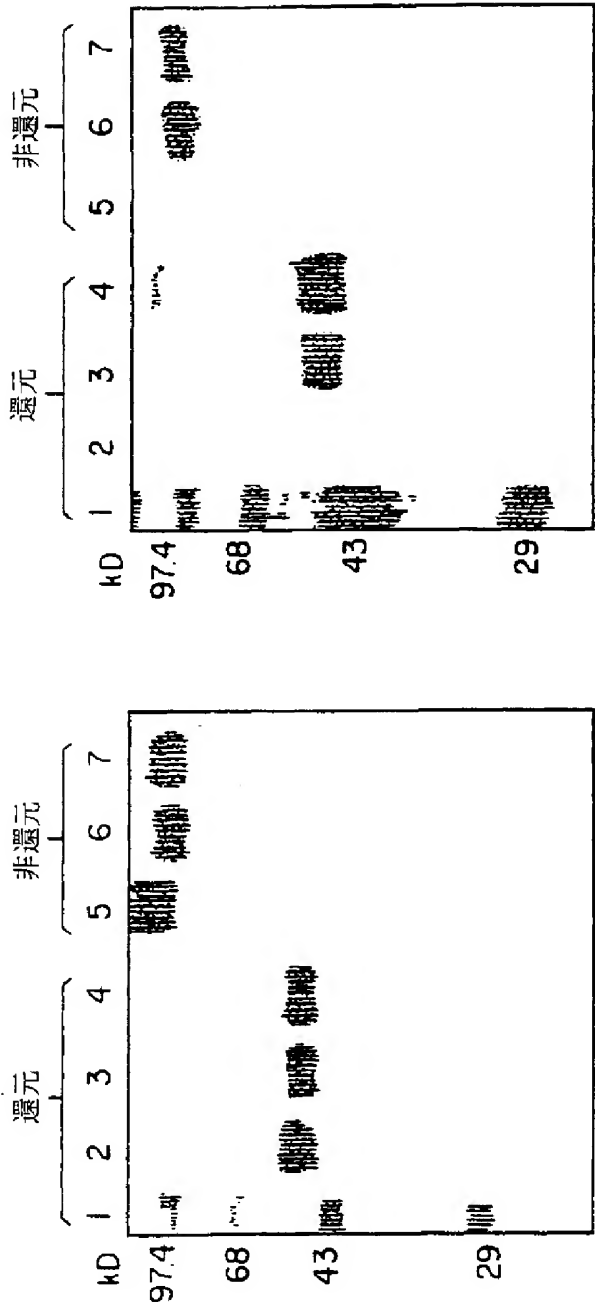


図2 b

図2 a

【図4】

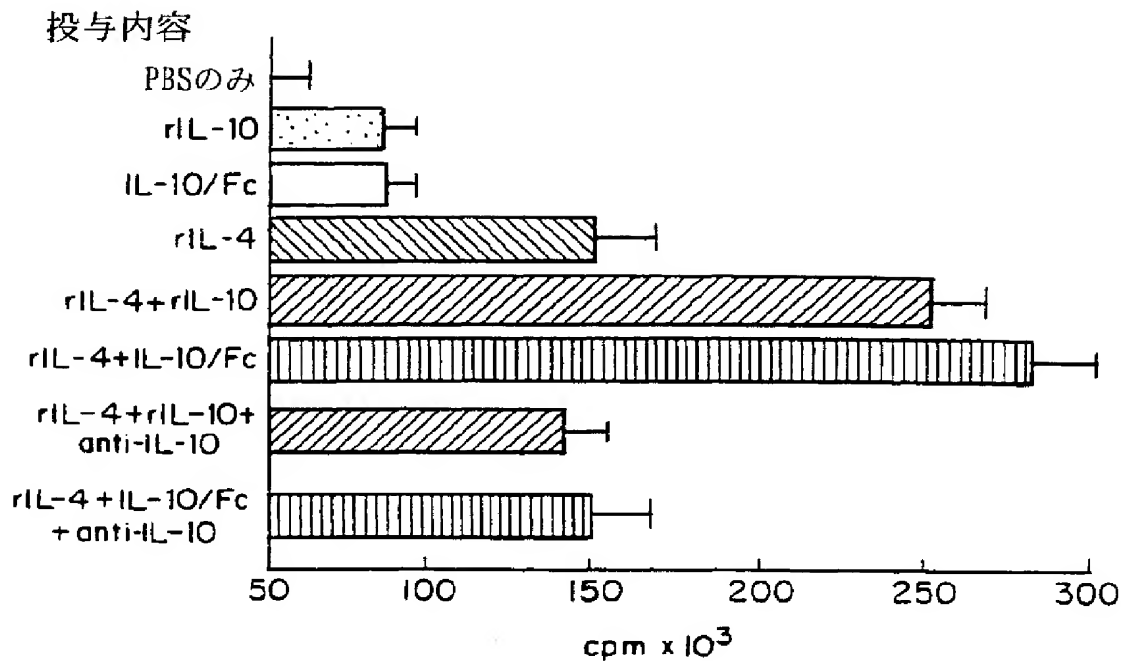


図4

【図5】

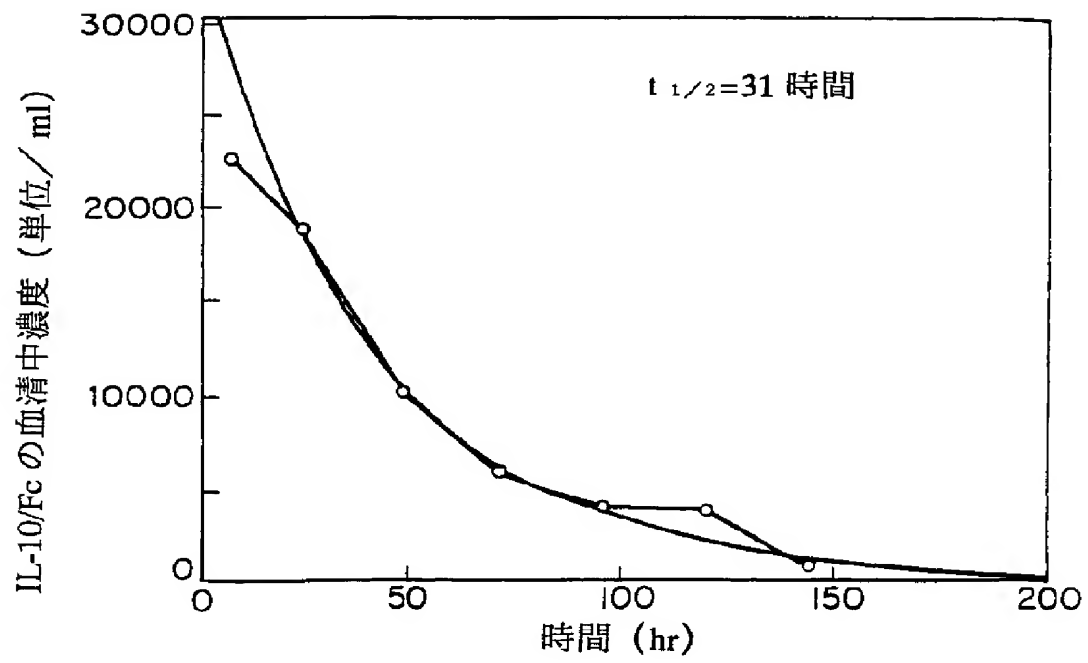


図5

【图6】

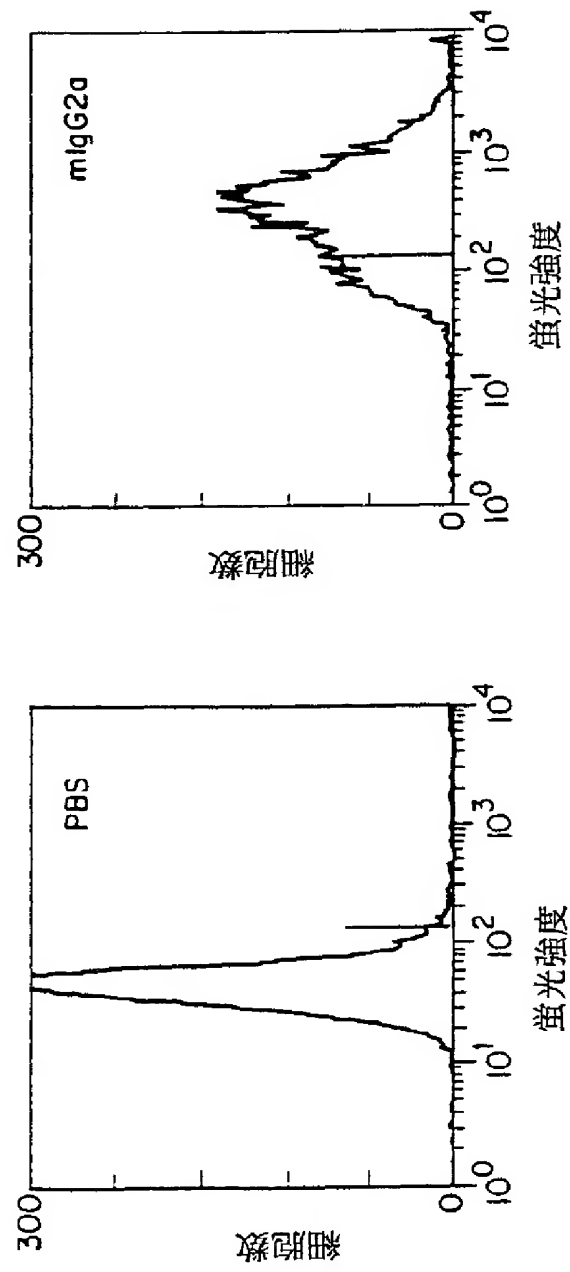


図6 a

図6 b

【図6】

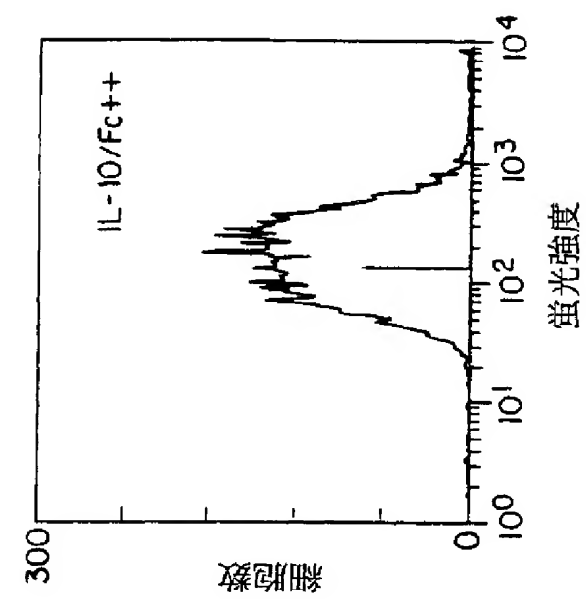


図6 d

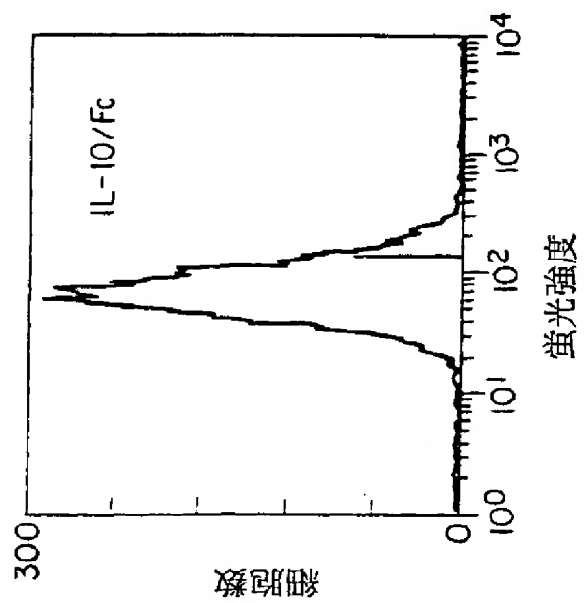


図6 c

【图 7】

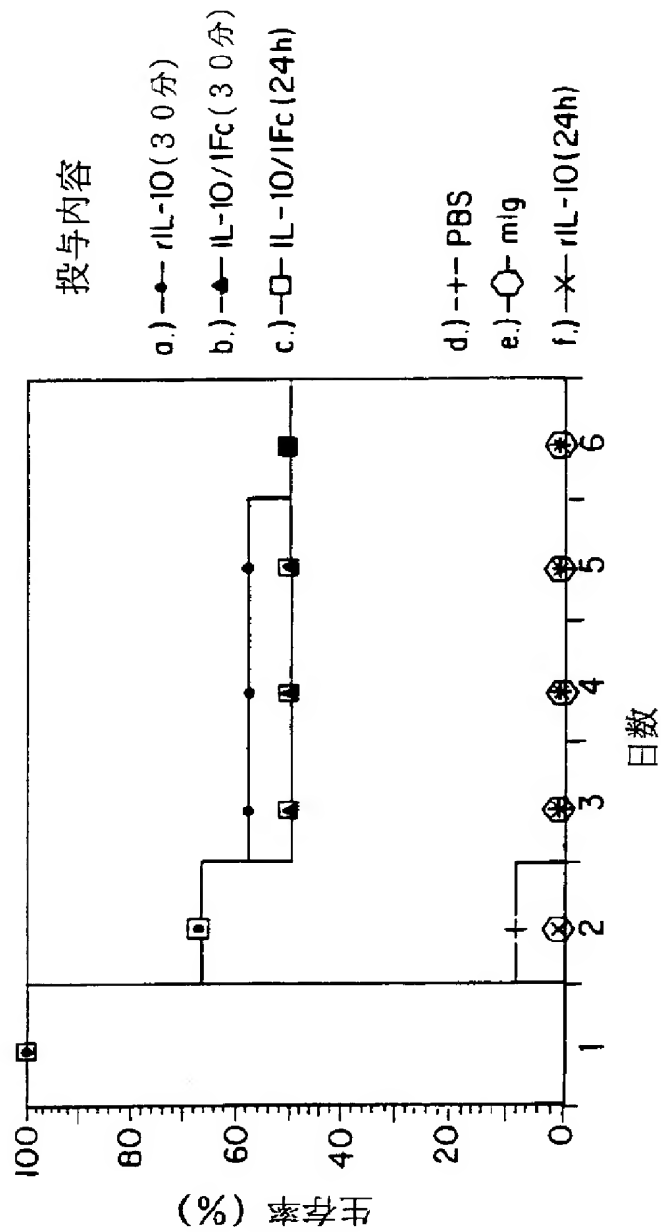


图 7

【図 8】

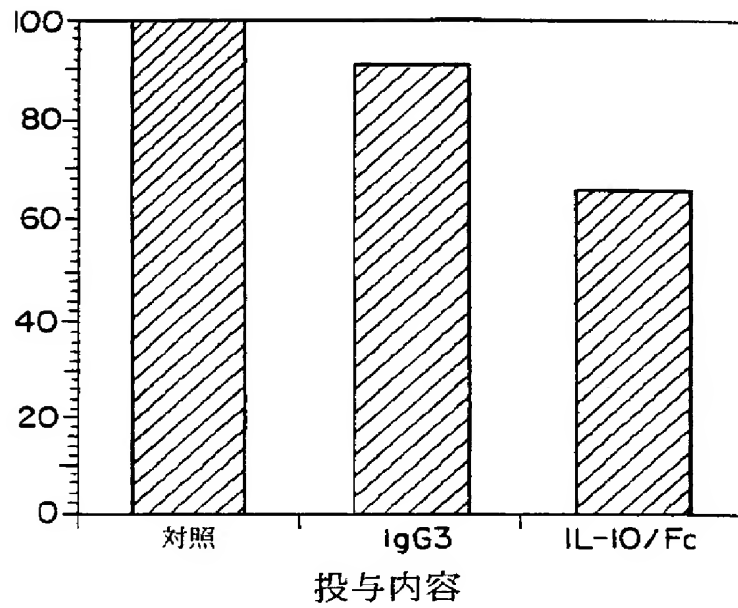


図 8

【図 9】

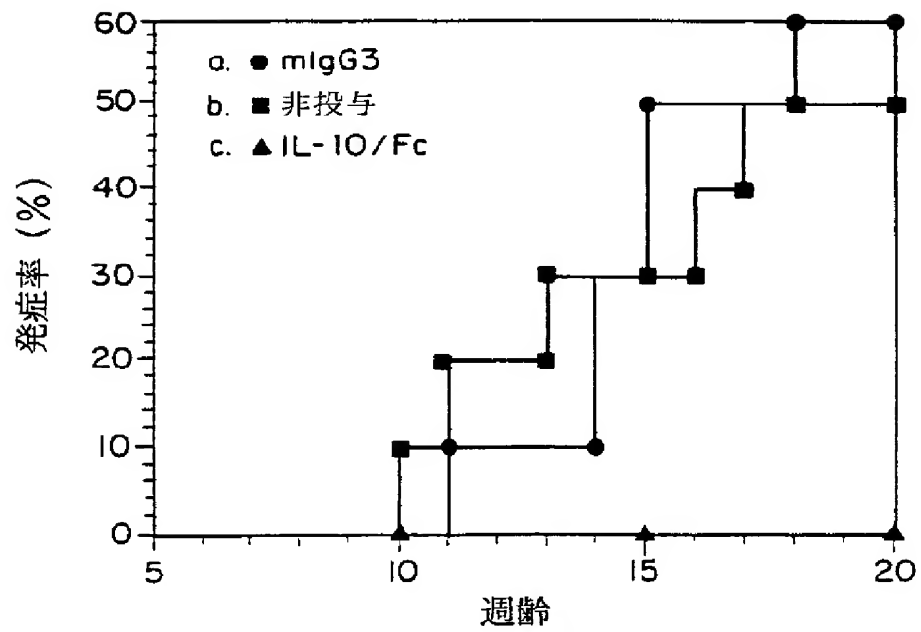


図 9

【図10】

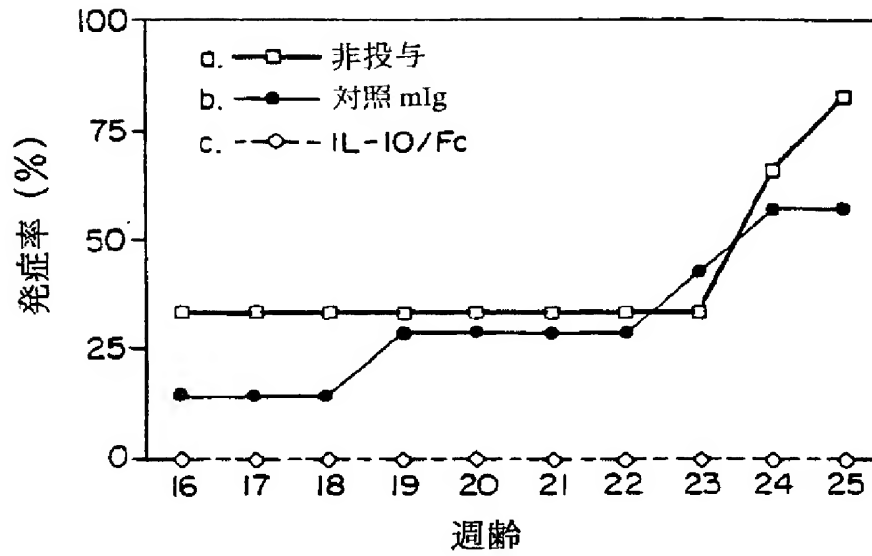


図10

【図11】

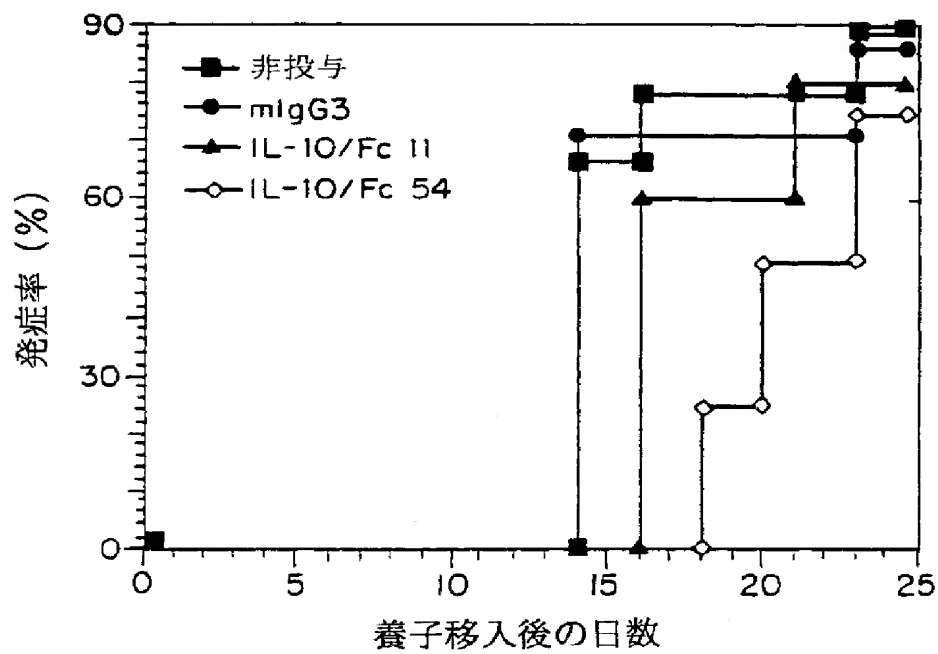


図11

【図12】

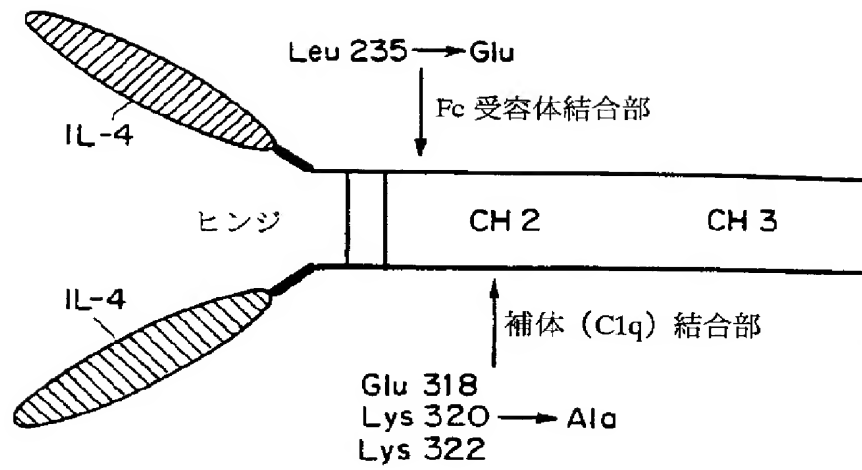


図 1 2

【図13】

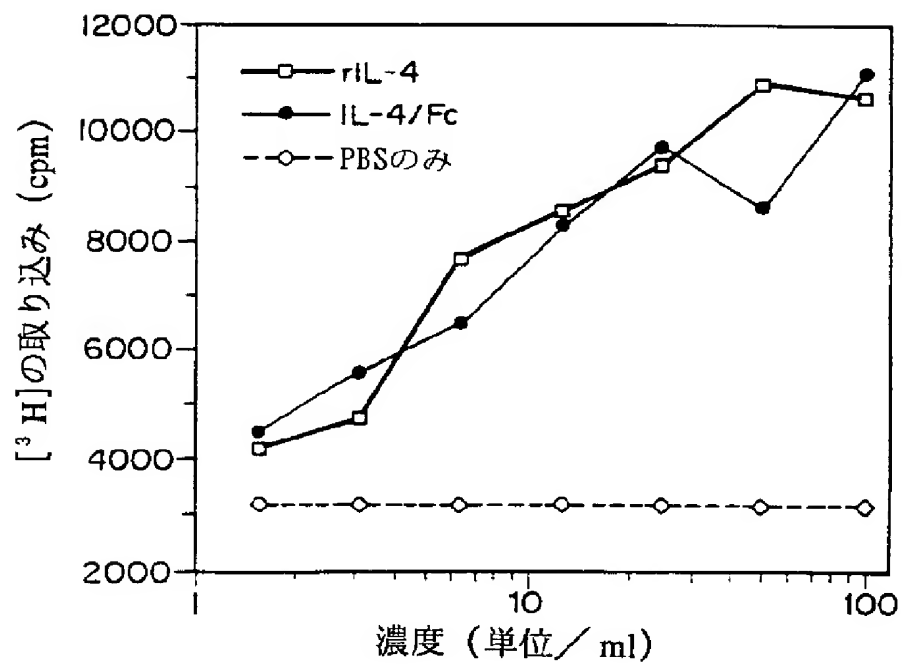


図 1 3

【図14】

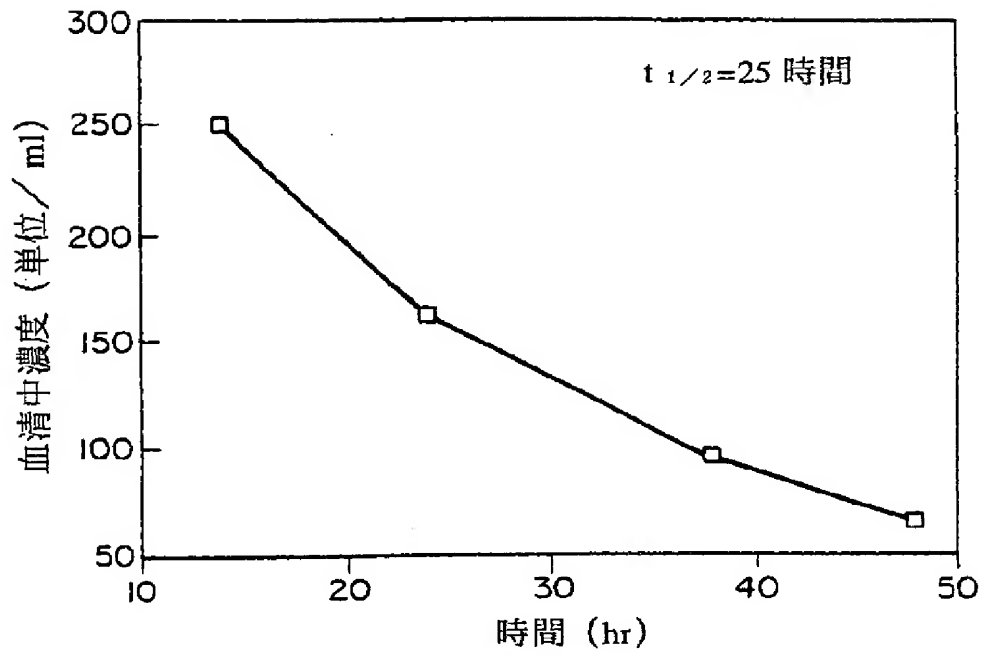


図 1 4

【図15】

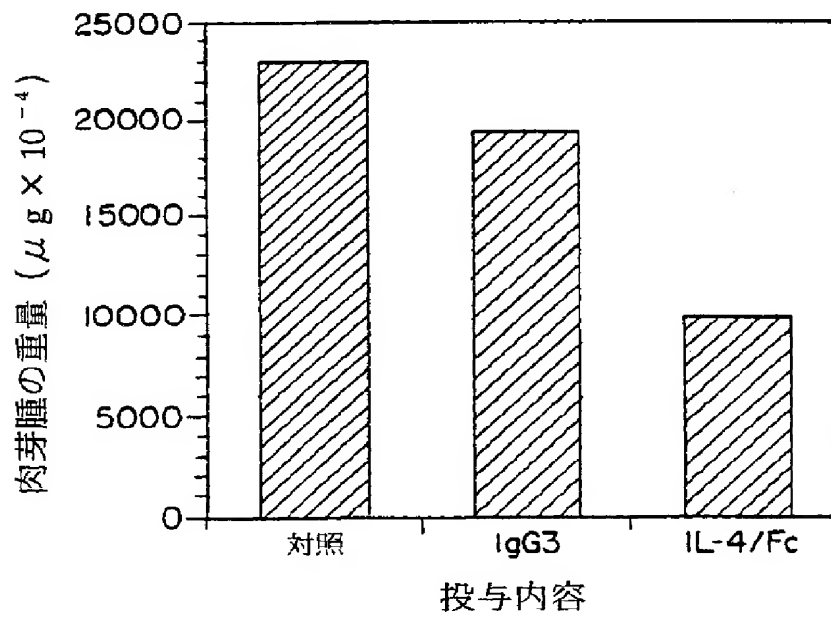


図 1 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/16046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : Please See Extra Sheet.

US CL : 530/351, 362, 387.1, 402; 514/2, 8, 12; 424/84, 85.1, 85.2

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/351, 402; 514/2, 8, 12; 424/84, 85.1, 85.2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, CAS ONLINE, MEDLINE, BIOSIS, SCISEARCH

search terms: chimeric, fusion, hybrid or conjugated cytokine, immunoglobulin, treatment, therapy or administration

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NATURE, Volume 337, issued 09 February 1989, Capon et al, "Designing CD4 Immuno adhesins for AIDS therapy", pages 525-531, see abstract and page 525, column 2, lines 19-35.	1-16
Y, P	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Volume 154, Number 10, issued 15 May 1995, Zheng et al, "Administration of Noncytolytic IL-10/Fc in Murine Models of Lipopolysaccharide-Induced Septic Shock and Allogeneic Islet Transplantation", pages 5590-5600, see abstract and page 5594, column 2, lines 13-26.	1-16
Y	US, A, 5,231,012 (MOSSMANN ET AL) 27 July 1993, see entire document.	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Z* document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

06 FEBRUARY 1996

Date of mailing of the international search report

16 FEB 1996

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

PREMA MERTZ

Facsimile No. (703) 305-3230

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/16046

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOLECULAR IMMUNOLOGY, Volume 28, Number 9, issued 1991, Hoogenboom et al, "Construction and Expression of Antibody-Tumor Necrosis Factor Fusion Proteins", pages 1027-1037, see abstract.	1-15
A	INFECTION AND IMMUNITY, Volume 62, Number 6, issued June 1994, Wagner et al, "Treatment with Anti-Interleukin-10 Monoclonal Antibody Enhances Early Resistance to but Impairs Complete Clearance of Listeria monocytogenes Infection in Mice", pages 2345-2353, see abstract.	16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US95/16046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (6):

A61K 38/19, 38/20; C07K 14/52, 14/525, 14/53, 14/535, 14/54, 14/545, 14/55, 14/76, 14/765, 16/46

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	F I	
C 0 7 K	14/525	C 0 7 K	14/54
	14/535		14/555
	14/54		14/76
	14/555		16/18
	14/76		19/00
	16/18	C 1 2 P	21/02 C
	19/00	A 6 1 K	37/02 ADS
C 1 2 N	15/02		37/66 ADU
C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00 C

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(72)発明者 スティール アラン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ
 ェルシュレイ クリフトン ロード 15